

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

VACCINATION DES BOVIDÉS CONTRE LA TUBERCULOSE ET MÉTHODE NOUVELLE DE PROPHYLAXIE DE LA TUBERCULOSE BOVINE

par A. CALMETTE et C. GUÉRIN.

Dans une série de mémoires publiés successivement depuis vingt années (1), nous avons établi un certain nombre de faits qui nous font mieux comprendre, que cela n'avait été jusqu'alors possible, le mécanisme de l'infection bacillaire et les conditions à remplir pour conférer aux organismes sensibles la résistance aux contaminations naturelles ou artificiellement provoquées.

Rappelons quelques-uns des plus importants.

En août 1906 et juillet 1907, dans ces *Annales*, nous avons montré que les *réinfections multiples* ou les *infections uniques massives* déterminent sûrement l'évolution d'une tuberculose mortelle chez les bovidés, alors que la maladie produite par une contamination *unique* guérit habituellement si l'animal est tenu à l'abri des contagions accidentelles.

Dès cette époque, nos recherches apportaient la preuve que

(1) Ces *Annales*, 1905, 1906, 1907, 1908, 1913, 1914, 1920.

les animaux, ainsi guéris au point de ne plus réagir à la tuberculine, ne sont plus susceptibles, au moins pendant un certain temps, d'être réinfectés, même avec des doses de bacilles virulents capables de donner aux témoins une tuberculose granuleuse aiguë mortelle en quelques semaines.

Ainsi, écrivions-nous, « nous sommes naturellement conduits à orienter nos recherches vers l'obtention de l'immunité vaccinale contre la tuberculose en introduisant dans le système lymphatique de l'organisme, par les voies normales d'infection, c'est-à-dire par le tube digestif, des bacilles tuberculeux atténués, modifiés ou privés de virulence (1) ».

Dans le même temps, H. Vallée, étudiant avec H. Rossignol (2) les effets de la méthode de vaccination antituberculeuse qu'avait proposée Behring, constatait, dans une expérience, qu'« une première atteinte bénigne et guérie de tuberculose confère à l'organisme une résistance marquée, quoique incomplète, à une réinfection grave ».

Les expériences de Römer (3), postérieures aux nôtres et faites sur des moutons et des cobayes, arrivaient aux mêmes conclusions.

Plus tard (4), nous avons montré que la tolérance de l'organisme vis-à-vis d'une infection ou de réinfections tuberculeuses est fonction de la présence, dans cet organisme, de bacilles vivants, virulents ou non, et qu'on peut conférer artificiellement cette tolérance aux jeunes bovidés en introduisant dans la circulation sanguine de ces animaux une dose convenable de notre bacille bovin dit « bilié », non virulent et non tuberculeux, mais encore doué d'une certaine toxicité et capable de provoquer la formation d'anticorps.

Ce bacille « bilié » est assez connu pour qu'il ne soit pas nécessaire d'insister sur ses caractères acquis. Rappelons seulement qu'il a pour origine une souche très virulente bovine, dite « lait de Nocard », transplantée pour la première fois sur pomme de terre cuite dans la bile de bœuf glycinée à 5 p. 100.

(1) Ces Annales, août 1906, p. 623.

(2) Bull. de la Soc. de Méd. vétér. prat. Rapport sur les expériences de Melun, 14 mars 1906.

(3) Sitzungsber. d. ärztl. Vereins zu Marburg, 19 mai et 22 juillet 1908; 21 mai 1909.

(4) Ces Annales, février 1913, avril 1914, septembre 1920.

le 8 janvier 1908, et réensemencée depuis, environ tous les quinze jours, sur ce même milieu (1).

Après quatre ans, notre bacille n'était plus virulent pour le bœuf. Il l'était encore pour le cheval.

Après treize ans de cultures successives sur pommes de terre biliées (5 janvier 1921 : 230^e passage), il était complètement privé de virulence, même à fortes doses, pour toutes les espèces animales. Il était devenu incapable de provoquer la formation de tubercules par inoculation intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée, et aussi par ingestion.

A cette dernière date, dans le but de fixer définitivement ses précieuses qualités, nous l'avons reporté et conservé désormais sur pomme de terre glycinée ordinaire.

Dès la première culture, qui fut abondante, nous avons vu réapparaître l'aspect et l'odeur connus des cultures de tuberculose, bien qu'au toucher à la spatule les bacilles soient moins secs, plus onctueux, plus faciles à étaler. Immédiatement aussi, la culture s'est accompagnée de production de tuberculine, qualité qu'elle paraissait avoir perdue dans les milieux en présence de bile. Nous avons fait une concentration glycinée de cette tuberculine : elle se comporte, vis-à-vis des bovidés tuberculeux, comme la meilleure tuberculine provenant de bacilles virulents.

Tous les cinq passages sur pomme de terre glycinée ordinaire la culture était inoculée aux doses de 1 à 10 milligrammes sous la peau de cobayes. Les doses supérieures à 3 milligrammes déterminaient un petit abcès guérissant spontanément et qui n'était accompagné d'aucun engorgement du ganglion inguinal correspondant. Aucun de nos animaux n'est devenu tuberculeux et *nous n'avons jamais réussi, par des réinoculations successives, à restituer à notre bacille des propriétés tuberculinogènes.*

(1) Le but que nous poursuivions en cultivant en séries ininterrompues le bacille tuberculeux en présence de bile de bœuf était de *modifier héréditairement la constitution physico-chimique du bacille* en l'entraînant à se développer dans un milieu extrêmement alcalin et particulièrement riche en lipoides (cholestérine 0 gr. 410 à 0 gr. 813 p. 1.000; lécithines et savons neutres 0 gr. 690 à 1 gr. 317 p. 1.000). Nous espérions rendre ainsi les enveloppes et le protoplasma bacillaires plus aisément digestibles par les phagocytes, ou tout au moins plus tolérables par ces derniers. Les faits ont démontré que nous étions dans la bonne voie.

Nous sommes donc en possession d'une véritable *race avirulente de bacille bovin*. Ce bacille, quoique *toxique* pour l'animal tuberculeux et producteur de tuberculine active, a perdu toute aptitude à créer des tubercules. Il est complètement inoffensif pour toutes les espèces animales, y compris le chimpanzé, et aussi pour l'homme, même par injection intraveineuse à la dose de quarante millions de corps microbiens vivants (1 milligramme).

C'est avec ce bacille, désigné désormais, pour la commodité du langage, par les initiales *BCG*, que nous avons effectué les expériences qui suivent et les inoculations préventives rapportées plus loin.

I. — Interprétation des réactions tuberculiniques chez les animaux vaccinés.

A maintes reprises, au cours de nos précédentes recherches, notamment dans celles relatées dans notre mémoire de septembre 1920 (1), nous avons été frappés de la rapidité avec laquelle cessaient de réagir à la tuberculine nos animaux vaccinés par voie intraveineuse, alors même que ceux-ci restaient parfaitement tolérants (jusqu'au maximum de dix-huit mois) vis-à-vis des bacilles virulents, également introduits par voie intraveineuse, ou absorbés par cohabitation étroite et continue avec des bovidés tuberculeux. Nous pensions alors que cette tolérance devait être liée à la présence des bacilles avirulents dans l'organisme et qu'elle cessait lorsque l'élimination de ces bacilles par les voies normales d'excrétion (glande hépatique, intestin et glandes mammaires) était achevée.

S'il en était ainsi, on devait essayer de prolonger cette période d'imprégnation vaccinale en introduisant les bacilles avirulents, non plus dans les veines, mais *sous la peau*, — procédé d'ailleurs plus simple et plus pratique, moins aléatoire aussi que l'absorption par les voies digestives —, et en renouvelant l'injection sous-cutanée *tous les ans*, par exemple, puisqu'elle paraît inoffensive.

(1) Ces *Annales*, 1920, p. 553.

C'est ce que nous avons tenté par l'expérience suivante :

Expérience. — 16 génisses bretonnes âgées de sept à huit mois, indemnes de tuberculose, sont divisées en deux lots : 8 d'entre elles reçoivent l'inoculation vaccinale *dans les veines*, les 8 autres la reçoivent *sous la peau du fanon*.

Les épreuves à la tuberculine sont pratiquées, pour tous les animaux de chaque lot, deux mois et six mois après l'inoculation. Elles donnent les résultats que voici :

Premier lot : Inoculation vaccinale pratiquée dans les veines.

<i>Tuberculination :</i>		
	APRÈS 2 MOIS	APRÈS 6 MOIS
Réaction positive	3	0
Réaction douteuse.	1	0
Réaction négative.	4	8

Deuxième lot : Inoculation vaccinale pratiquée sous la peau du fanon.

<i>Tuberculination :</i>		
	APRÈS 2 MOIS	APRÈS 6 MOIS
Réaction positive	8	5
Réaction douteuse	0	3
Réaction négative.	0	0

La constatation est nette : les animaux vaccinés par inoculation *sous la peau* conservent la faculté de réagir positivement à la tuberculine plus longtemps que les animaux vaccinés dans les veines.

Nous avons de multiples raisons d'admettre que cette persistance de la sensibilité à la tuberculine est corrélative de la vie symbiotique du bacille tuberculeux avec les éléments cellulaires, non point fixes, mais *fixés*.

De cette vie symbiotique résulte, comme l'un de nous l'a écrit ailleurs (1), un complexe cellulaire analogue au *lichen*, qui est le *produit de la symbiose d'une algue et d'un champignon*. Lorsque ce complexe est réalisé, et tant qu'il subsiste, tant qu'il échappe aux actions défensives phagocytaires, l'organisme dont il est le parasite réagit d'une façon caractéristique vis-à-vis de nouveaux apports de tuberculine ou de bacilles : c'est ce

(1) A. CALMETTE. *L'infection bacillaire et la tuberculose*, Masson, édit., 2^e édition, Paris, p. 108.

que nous appelons le « phénomène de Koch », parce que son observation a conduit Robert Koch à la découverte de la tuberculine.

Il apparaît donc que la résistance aux infections ou aux réinfections tuberculeuses — résistance naturelle ou artificiellement provoquée — doit se traduire, comme l'infection elle-même, par la sensibilité à la tuberculine.

Par suite, la réaction tuberculinique positive ne peut plus être considérée comme un critérium d'infection. Elle est bien plutôt, chez les bovidés, comme chez l'homme, un critérium d'immunité. Elle révèle seulement l'existence, quelque part dans l'organisme qui réagit, d'un foyer actif ou latent, récent ou ancien, de vie symbiotique d'un bacille, *virulent* ou *non virulent*, avec quelque cellule lymphatique, macrophage ou cellule géante.

De ce fait, elle perd définitivement, sinon tout intérêt, du moins toute importance diagnostique, puisque le jour où tous les sujets, hommes ou animaux sensibles à la tuberculose, seront, dans un but de prophylaxie, artificiellement imprégnés de bacilles avirulents, ils réagiront de la même manière que les sujets infectés.

II. — Sort des bacilles-vaccins introduits sous la peau.

Si l'on injecte à un bovidé indemne de tuberculose, sous la peau du fanon, une dose faible de bacilles-vaccins, telle que 2 milligr. 5, on n'observe aucune réaction locale autour du point inoculé et, à aucun moment dans la suite, l'animal ne réagit à l'épreuve de la tuberculine. Cette dose est insuffisante pour lui conférer une résistance appréciable à l'infection ultérieure par injection intraveineuse de bacilles virulents.

Par contre, si la quantité de bacilles-vaccins injectée est plus considérable, de 50 à 100 milligrammes, il se produit presque immédiatement une lésion locale sur l'évolution et la persistance de laquelle nous reviendrons plus loin en relatant nos expériences de vaccination.

Cette lésion n'a aucune tendance à suppurer et elle finit le plus souvent par disparaître sans laisser de traces.

Pourtant une génisse, qui avait ainsi reçu dans le fanon 50 milligrammes de bacilles-vaccins et qui, dix mois plus tard, fournit une intradermo-réaction positive, conservait autour du point inoculé une lésion d'allure kystique, grosse comme un œuf de pigeon, légèrement fluctuante et flottant librement dans le tissu cellulaire conjonctif. Une ponction à la seringue, après rasage de la peau, permit d'en retirer environ 1 c. c. $1/2$ de liquide séreux, faiblement opalescent, ne renfermant aucun leucocyte, mais riche en bacilles granuleux imparfaitement colorables au Ziehl. Une partie de ce liquide servit à ensemencer 13 tubes de milieu de Petroff. L'autre fut diluée dans 2 cent. cubes d'eau stérile et inoculée sous la peau de la cuisse à quatre cobayes. Aucun des tubes n'a donné de culture et les quatre cobayes sont restés indemnes de toute lésion locale ou ganglionnaire. Sacrifiés trois mois plus tard, ils furent trouvés parfaitement sains.

On ne peut en conclure que les bacilles-vaccins étaient morts, mais ils étaient à tout le moins assez dégradés pour avoir perdu leur vitalité.

Retenons pour l'instant que *cette inoculation massive de bacilles-vaccins est immédiatement, et reste ultérieurement inoffensive.*

Il nous a paru intéressant de rechercher si des bacilles tuberculeux virulents, placés dans les mêmes conditions, c'est-à-dire soustraits à l'action directe des leucocytes, subissaient la même dégradation.

Nous savons déjà que de tels bacilles, enfermés dans des sacs de collodion dont l'étanchéité doit être absolue, et placés dans le péritoine de lapins, non seulement ne se multiplient pas, mais cessent après quelques mois d'être inoculables. Pour réaliser l'expérience chez le bœuf, nous avons chargé, sous le vide, des *billes de pierre ponce* de 10 millimètres de diamètre, d'une émulsion concentrée de bacilles bovins virulents. La charge retenue par une bille était de 2 milligr. 5 de bacilles.

Après incision de la peau du fanon d'un bovidé neuf et dilacération du tissu conjonctif sous-cutané à l'aide de la canule d'un gros trocart, une bille ainsi chargée a été refoulée profondément sous la peau, par la lumière de la canule. La plaie opératoire, scellée par des agrafes de Michel, s'est cicatrisée par

première intention. On percevait facilement le corps étranger mobile dans le tissu conjonctif et, autour de lui, une faible réaction cellulaire.

A aucun moment, c'est-à-dire après un, trois et six mois, l'animal n'a réagi à la tuberculine.

Six mois après l'insertion de la bille, celle-ci fut enlevée très aisément par une incision simple à son niveau. Elle n'était retenue que par quelques faibles adhérences conjonctives. Une coque continue, d'à peine 1 millimètre d'épaisseur, l'entourait, exactement appliquée à sa surface, sans interposition de liquide. Le raclage de la face interne de cette capsule ne montrait aucun leucocyte. La bille fut écrasée et triturée au mortier d'agate dans 5 cent. cubes d'eau physiologique. Le produit de cette trituration montrait au microscope un nombre considérable de bacilles dont beaucoup étaient granuleux, mais faciles à colorer par le Ziehl. Injecté sous la peau de quatre cobayes, il laissa ces animaux indemnes.

Quant au bovidé porteur de cette bille, il fut inoculé, le jour même de l'enlèvement de celle-ci, avec 5 milligrammes de *bacilles virulents*, par voie intraveineuse. Il succomba cinquante-huit jours après à une granulie pulmonaire aiguë, n'ayant, par conséquent, acquis aucune résistance.

C'est donc que, dans les conditions de cette expérience, aucune symbiose ne s'était établie entre les bacilles et les cellules, de sorte que le « *phénomène de Koch* », traduisant la résistance aux réinfections, ne pouvait pas se manifester.

Nous avons pu constater d'ailleurs que, même chez le cobaye, la mise en évidence de ce « *phénomène* » est corrélative de la dose de bacilles de réinfection :

EXPÉRIENCE : Quatre cobayes reçoivent sous la peau de la cuisse droite 0 milligr. 1 de bacilles virulents (pesés à l'état frais). Dix-huit jours plus tard, alors que la lésion locale évolue, ils reçoivent, en même temps que quatre témoins, sous la peau de la cuisse gauche, 0 milligr. 02 des mêmes bacilles. Trente jours après cette inoculation, alors que les témoins présentent tous le ganglion inguinal caractéristique, dur et mobile, aucun des quatre cobayes réinfectés avec cette faible dose n'a présenté de lésion locale nécrotique. La peau, autour du point inoculé, reste souple, sans trace d'infiltration sous-jacente, et les ganglions inguinaux sont imperceptibles.

Dans de pareilles conditions, les bacilles de réinfection sont donc fort bien tolérés.

Par contre, si la dose de bacilles réinjectés est sensiblement égale ou plus grande que celle qui a réalisé la première infection, l'organisme tuberculeux ne les supporte pas. Il s'en débarrasse par la formation rapide d'un abcès qui se vide bientôt à l'extérieur, puis se cicatrise. C'est alors le *phénomène de Koch* typique, tel qu'on l'observe chez les bovidés réagissant à la tuberculine auxquels on injecte, sous la peau, une forte dose de bacilles même peu virulents.

Il arrive sans doute souvent que des bovidés réagissant à la tuberculine, spontanément contaminés, offrent une résistance considérable aux réinfections, même massives. Nous en trouvons un remarquable exemple dans l'expérience que voici :

EXPÉRIENCE: En 1922, nous possédions une génisse de quatre ans en excellent état d'embonpoint, qui réagissait depuis deux ans à l'épreuve tuberculinique renouvelée tous les six mois et que nous avions maintenue pendant tout ce long délai complètement isolée de toute contamination de voisinage.

La guérison spontanée ne s'étant donc pas produite, nous lui inoculons, dans la veine jugulaire, 5 milligrammes de bacilles bovins virulents, dose qui produit constamment une tuberculose aiguë mortelle dans le délai maximum de soixante jours.

Dès la neuvième heure après l'inoculation, la température monte à 41°5 et l'animal est pris de tremblements avec violents accès de toux. La fièvre reste élevée pendant six jours, mais diminue peu à peu, et tout rentre dans l'ordre. L'appétit et l'embonpoint se maintiennent. Quatre mois après, la génisse est abattue. On trouve, à l'autopsie, 7 nodules tuberculeux gros comme des grains de millet, dans un ganglion trachéo-bronchique, et un tubercule caséocalcaire, de la grosseur d'un grain de chènevis, à l'extrémité antérieure du poumon droit.

Les organes de la cavité splanchnique sont indemnes. On prélève avec des instruments stériles un des ganglions mésojéjunaux, un des ganglions en bordure de l'artère colique, le ganglion de la valvule iléo-cæcale et un ganglion hépatique. Tous ces ganglions, d'aspect et de volume normaux, sont triturés séparément et leur suc exprimé et injecté sous la peau de 16 cobayes (4 pour chaque ganglion). Un mois après, tous ces cobayes sans exception sont porteurs de l'adénite spécifique et la moitié d'entre eux ont des lésions d'inoculation supprimées.

Il est évident que, chez notre génisse, ce sont les petits tubercules de son ganglion trachéo-bronchique et de son poumon droit qui la sensibilisaient à la tuberculine, et il est fort probable que ce sont les bacilles de réinfection, si aisément tolérés par elle, que nous avons retrouvés dans les ganglions, en apparence sains, de sa cavité splanchnique. Mais, ce que nous voulons surtout retenir de cette observation, c'est que notre génisse, atteinte de lésions bénignes de tuberculose depuis

plus de deux ans, s'est montrée capable de supporter, sans que sa maladie soit aggravée, une réinfection artificielle par plus de deux cents millions de bacilles de grande virulence.

III. — Expériences de vaccination des bovidés par inoculation sous-cutanée massive de BCG.

L'examen critique des faits qui précèdent, ainsi que les résultats des multiples essais réalisés par nous, et dont il serait trop long de relater tous les détails, nous ayant montré les avantages manifestes de la vaccination par voie sous-cutanée en un temps, par une dose massive de notre bacille avirulent, non tuberculigène (BCG), nous avons entrepris la série d'expériences que voici :

Protocole. — Vingt génisses bretonnes de sept à huit mois, indemnes de tuberculose, sont réparties en deux lots.

Douze sont vaccinées et huit, maintenues dans les mêmes conditions, servent de témoins.

Les douze génisses du premier lot, numérotées de 1 à 12, sont divisées en 6 groupes de deux animaux (1-2, 3-4, 5-6, etc.). Chaque groupe occupe un box isolé du suivant.

Les numéros impairs reçoivent, dans la profondeur du tissu conjonctif du fanon, une seule inoculation de 400 *milligrammes* de BCG émulsionnés dans 10 cent. cubes d'eau physiologique.

Les numéros pairs sont inoculés de la même manière, mais avec 50 *milligrammes* de BCG dans 10 cent. cubes d'eau physiologique.

Nous décidons qu'un témoin sera affecté à chacun de ces six groupes et que l'inoculation virulente d'épreuve sera faite aux animaux de chacun de ces groupes, respectivement un, trois, six, douze, quinze et dix-huit mois après la vaccination, *en même temps qu'à son témoin.*

A. — RÉACTION DES ANIMAUX A L'INOCULATION VACCINALE.

Elle fut la même avec 50 et 400 *milligrammes*.

a) RÉACTION LOCALE. — Vingt-quatre heures après l'inoculation on constate, dans le tissu conjonctif, l'existence d'une

masse œdémateuse molle, grosse comme une noix ou un œuf de poule. Les jours suivants, cette masse se densifie, devient dure, lisse, mobile. Chez quelques animaux (2 sur 12), un œdème de nouvelle formation réapparaît du treizième au dix-huitième jour et semble empâter la petite tumeur; puis tout rentre dans l'ordre. Cette lésion n'a aucune tendance à sup-purer.

Un de nos vaccinés (n° 10) mort vingt-cinq jours après l'inoculation, de gastrite ulcéreuse, nous a permis d'étudier la structure de la tumeur à ce moment. C'était une masse dure comme du caoutchouc, longue de 5 centimètres, épaisse de 2, formée de tissu fibreux, lardacé, emprisonnant des îlots de nécrose de couleur jaune d'or mat, ressemblant à s'y méprendre à de vieilles lésions tuberculeuses d'un ganglion. Ces îlots sont entourés chacun d'une coque résistante dont le contenu, qui s'énuclée facilement, contient un nombre considérable de corps bacillaires assez mal colorables.

La lésion vaccinale, ainsi constituée sous la peau, diminue lentement de volume. Elle reste perceptible au sixième mois et tend à disparaître du dixième au dix-huitième. Elle est toujours indolore.

b) RÉACTION GÉNÉRALE. — La plupart de nos animaux (9 sur 12) n'ont présenté aucune élévation de température, aucun trouble de la santé ni de l'appétit. Chez 23 p. 100 d'entre eux (3 sur 12), nous avons constaté, du quinzième au dix-huitième jour, une poussée fébrile assez forte (de 38°6 à 40°5) s'accompagnant de tristesse et d'anorexie. La fièvre dure cinq ou six jours, puis disparaît et l'état général redevient excellent (fig. 1). Cette hyperthermie tardive rappelle exactement ce que nous constatons lors de nos essais de vaccination par voie intraveineuse (1). Elle résulte sans doute d'une septicémie bacillaire consécutive au passage d'un plus ou moins grand nombre de corps microbiens dans la circulation sanguine.

c) RÉACTION TUBERCULINIQUE. — Nous avons jugé préférable de ne pas soumettre nos animaux vaccinés à des épreuves péri-

(1) *Ces Annales*, février 1913.

diques de tuberculine par voie sous-cutanée, afin de ne pas modifier leur état de résistance ou de sensibilisation par une accoutumance intempestive. L'intradermo-réaction n'ayant pas le même inconvénient, nous l'avons exclusivement pratiquée.

Cette réaction reste positive tant que persiste la lésion vaccinale du tissu conjonctif, du moins tant que celle-ci demeure nettement perceptible au toucher. Elle ne devint négative

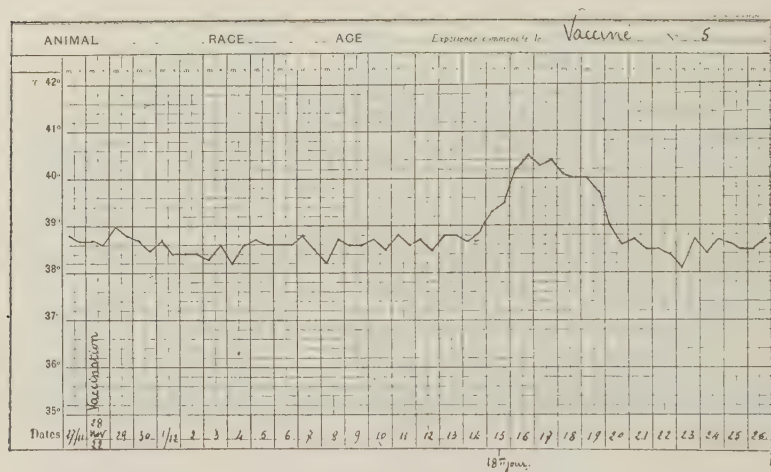


FIG. 1.

qu'à partir du sixième mois chez 2 animaux sur 7 (29 p. 100). Au douzième mois, un seul réagissait positivement.

B. — RÉACTION DES TÉMOINS A L'INOCULATION D'ÉPREUVE.

Nous avons utilisé pour nos inoculations d'épreuve un bacille bovin isolé directement par l'un de nous, d'une lésion pleurale d'abattoir, sur milieu de Pétrof, et dont 1/250 de milligramme tue le cobaye dans le délai moyen de quatre-vingt-dix jours après injection sous la peau.

La dose employée pour les bovidés a été uniformément de 5 milligrammes (pesés à l'état frais) inoculés *dans la veine jugulaire*.

Chez nos bovidés témoins, l'inoculation d'épreuve n'a jamais été suivie d'une réaction thermique immédiate. Ce n'est qu'après

une période d'incubation de treize à quinze jours qu'on voit brutalement se manifester une violente hyperthermie (2°) en

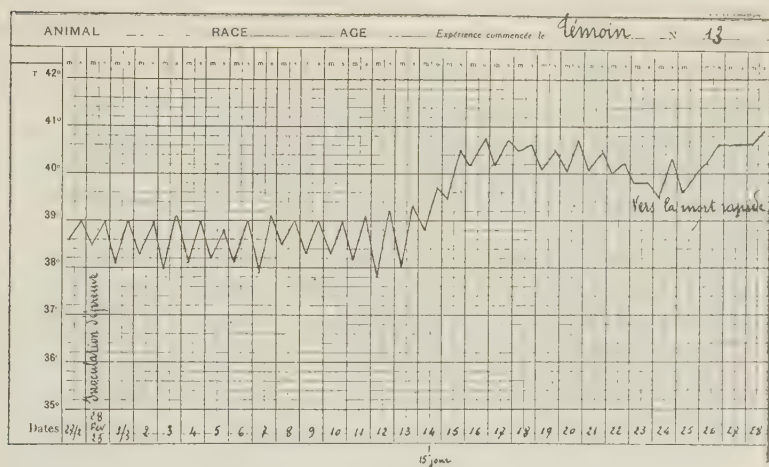


FIG. 2.

même temps que l'état général devient moins bon. La température reste élevée, la toux est fréquente, le nombre des mouvements respiratoires augmente jusqu'à 80 et plus. La mort

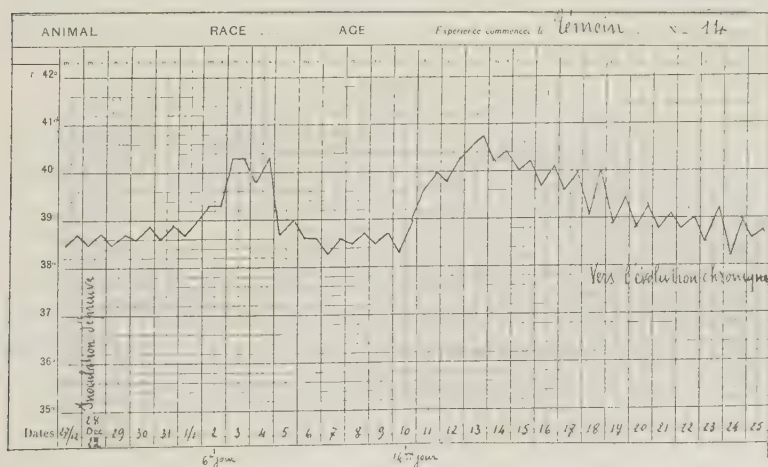


FIG. 3.

survient du trentième au quarante-cinquième jour (fig. 2). Elle est déterminée par une granulie pulmonaire massive.

Quelques témoins, par exception, ont fait une élévation de température plus précoce, du quatrième au sixième jour (40°), pendant au maximum trois jours; puis tout rentre dans l'ordre jusqu'au treizième ou quinzième jour, délai après lequel l'ascension thermique ordinaire débute (fig. 3). Mais, chez ces animaux, le tableau clinique change. Après une hyperthermie qui dure huit à douze jours, avec tendance quotidienne à la baisse, l'état général semble s'améliorer; la respiration est plus facile, la température redevient presque normale. Toutefois, les accès

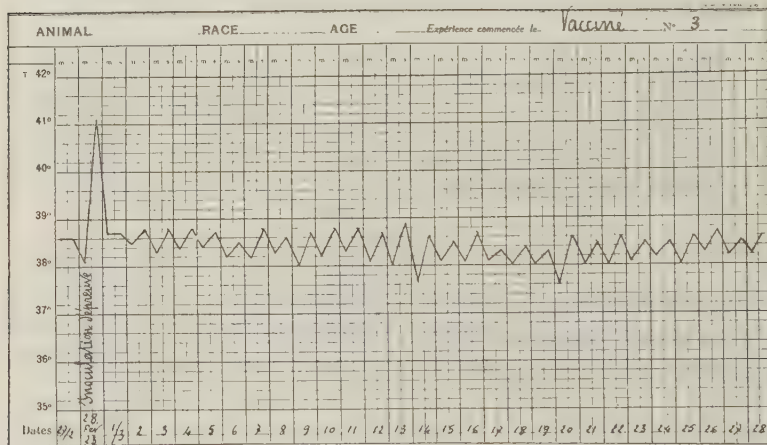


FIG. 4.

de toux persistent et les lésions de tuberculose miliaire évoluent, ne provoquant la mort qu'après plusieurs mois. Cependant elles sont toujours largement constituées dès la fin du deuxième mois.

La réaction thermique latente, ainsi observée chez quelques animaux neufs après l'inoculation virulente intraveineuse, nous paraît traduire un état particulier de résistance dont la cause nous échappe. Peut-être est-il dû à une très minime infection bacillaire préexistante, que la tuberculine n'a pas révélée.

C. — RÉACTION DES VACCINÉS A L'INOCULATION D'ÉPREUVE.

Chez les bovidés vaccinés, l'inoculation d'épreuve est toujours suivie immédiatement d'une violente réaction thermique (40°5-

41°) dont le maximum est constaté de neuf à douze heures après l'injection intraveineuse des bacilles virulents (fig. 4). Quelque-

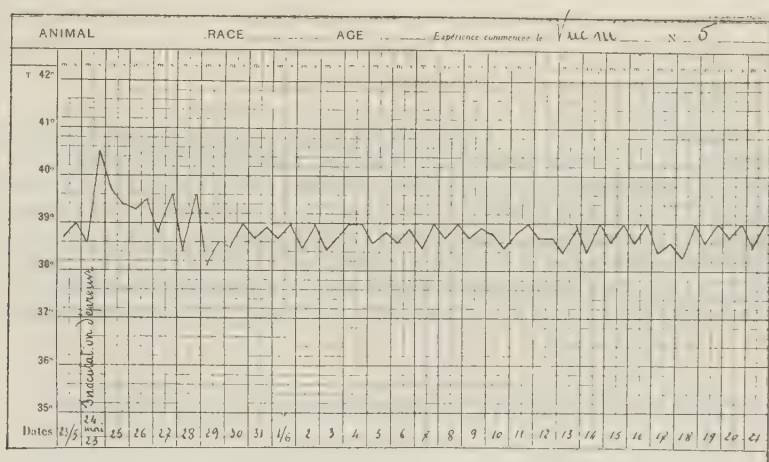


FIG. 5.

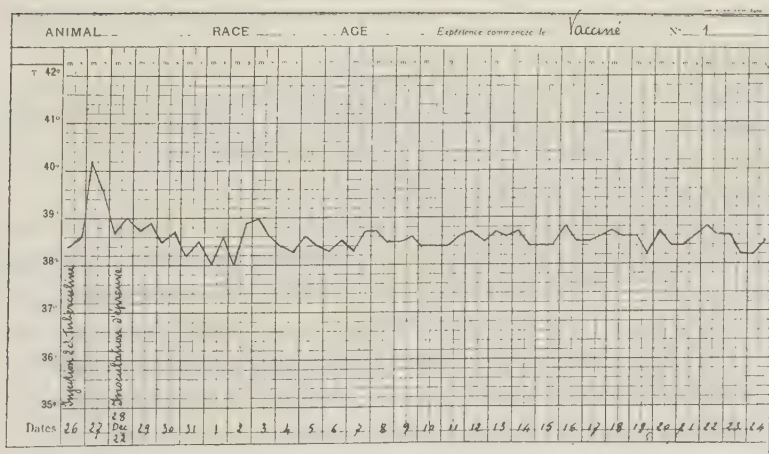


FIG. 6.

fois cette réaction disparaît très vite, ou bien elle persiste de trois à six jours en s'effaçant graduellement (fig. 5); le plus souvent, au bout de vingt-quatre heures tout est rentré dans l'ordre et, à aucun moment dans la suite, la santé des animaux

ne sera troublée. Rien ne pourra laisser soupçonner l'épreuve extrêmement sévère qu'ils ont subie.

Cette réaction brutale, immédiate, est constante même chez les vaccinés qui, quelques jours avant l'épreuve virulente, ont une intradermo négative. Elle est certainement de nature tuberculinique et en voici la preuve :

EXPÉRIENCE. — Trente-six heures avant l'inoculation virulente, chez un vacciné, nous injectons sous la peau 3 cent. cubes de tuberculine diluée. La réaction thermique se développe de la dixième à la quinzième heure après l'injection. Vingt-quatre heures plus tard, nous faisons l'inoculation d'épreuve avec les bacilles virulents. Celle-ci n'est suivie d'aucune hyperthermie, ainsi que le montre la *figure 6*. C'est exactement ce que l'on observe chez les bovidés tuberculeux qui réagissent fortement à une première tuberculinisation et qui ne réagissent plus si on leur réinjecte la même dose de tuberculine deux ou trois jours après.

D. — RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES POUR CHAQUE GROUPE DE BOVIDÉS VACCINÉS.

Groupe I. — Vaccinés n^{os} 1 et 2. — Témoin n^o 13.

Les deux vaccinés sont éprouvés en même temps que le témoin, *un mois après la vaccination*.

Le *témoin 13* est sacrifié, très amaigri, soixante jours après l'épreuve. Son autopsie montre une tuberculose miliaire des poumons avec des tubercules à tous les stades, depuis la tête d'épingle jusqu'au grain de chènevis caséeux.

Le *vacciné n^o 2* est éprouvé, bien qu'il ait, de temps en temps, des accès de toux résultant de ce qu'il était atteint de bronchite vermineuse. Il émettait un jetage muco-purulent contenant des embryons de strongles. Nous avons essayé sans succès de le traiter par des injections phéniquées, intratrachéales. L'animal se cachectisa de plus en plus et succomba cinq mois et sept jours après l'inoculation d'épreuve.

Son autopsie, hormis les désordres causés par les parasites, ne permit pas de déceler la moindre lésion tuberculeuse. Le ganglion prétrachéo-bronchique gauche est prélevé, trituré, exprimé, et le produit inoculé sous la peau de quatre cobayes. Trente jours plus tard, les quatre cobayes sont porteurs de l'adénite spécifique.

Cette observation tire un intérêt particulier de ce fait qu'il

s'agit d'un animal chez lequel, malgré son état complet de déchéance ayant abouti à la mort par cachexie, la protection vaccinale a tout de même empêché l'évolution de la tuberculose virulente.

Le vacciné n° 1, resté en parfait état, est abattu *douze mois après l'épreuve*. Il est complètement indemne de tuberculose. Le ganglion prétrachéo-bronchique gauche est prélevé, trituré, exprimé, et le produit inoculé sous la peau de quatre cobayes.

Quarante-cinq jours après, les quatre cobayes, qui ne présentent aucune adénite, sont sacrifiés. L'examen le plus minutieux ne révèle chez eux aucune lésion tuberculeuse. Nous reviendrons tout à l'heure sur ce fait, auquel nous attachons une grande importance.

Groupe II. — Vaccinés n°s 3 et 4. — Témoin n° 14.

Les deux vaccinés sont éprouvés, en même temps que le témoin, *trois mois après la vaccination*.

Le témoin n° 14 meurt quarante-quatre jours après l'inoculation : granulie pulmonaire massive.

Les vaccinés 3 et 4, en excellent état, sont abattus *onze mois après l'épreuve*. Ils sont indemnes de tuberculose. Leurs ganglions prétrachéo-bronchiques gauches sont prélevés, triturés, exprimés, et les produits inoculés séparément sous la peau de quatre cobayes. Quarante-cinq jours après, les quatre cobayes inoculés avec le ganglion du vacciné n° 3 sont sacrifiés et trouvés indemnes. Par contre, ceux inoculés avec le ganglion du vacciné n° 4 sont porteurs de l'adénite spécifique.

Groupe III. — Vaccinés n°s 5 et 6. — Témoin n° 15.

Les deux vaccinés sont éprouvés, en même temps que le témoin, *six mois après la vaccination*.

Le témoin 15, en très mauvais état, incapable de se tenir debout, est sacrifié soixante jours après l'inoculation d'épreuve. Tuberculose miliaire des deux poumons avec foyers d'hépatisation.

Les vaccinés 5 et 6, en excellent état d'embonpoint, sont abattus *huit mois après l'épreuve*. Ils sont trouvés indemnes de

tuberculose. Leurs ganglions trachéo-bronchiques gauches sont inoculés séparément sous la peau de quatre cobayes ; quarante-cinq jours plus tard, les huit cobayes sont porteurs de l'adénite spécifique.

Groupe IV. — Vaccinés n^{os} 7 et 8. — Témoins 16 et 16 bis.

Les deux vaccinés sont éprouvés, en même temps que les témoins 16 et 16 bis, *douze mois après la vaccination.* (En raison de ce long délai d'une année, nous avons cru nécessaire de prendre deux témoins.)

Le témoin 16 meurt trente-deux jours après l'inoculation : granulie pulmonaire massive.

Le témoin 16 bis, réduit à l'état de squelette, meurt cinquante-huit jours après l'inoculation : tuberculose miliaire suraiguë.

Les vaccinés 7 et 8, en excellent état, sont abattus *trois mois après l'épreuve.* Ils sont trouvés indemnes de tuberculose. Leurs ganglions prétrachéo-bronchiques gauches sont inoculés séparément sous la peau de quatre cobayes. Quarante-cinq jours après, les huit cobayes sont porteurs de l'adénite spécifique.

Groupe V. — Vacciné n^o 9. — Témoin n^o 17.

(Le vacciné n^o 10 est mort tout au début de l'expérience, vingt-cinq jours après la vaccination, de gastrite ulcéreuse.)

Le vacciné n^o 9 est éprouvé, en même temps que son témoin 17, *quinze mois après la vaccination.*

Le témoin 17 meurt cinquante-quatre jours après l'inoculation : tuberculose miliaire aiguë.

Le vacciné n^o 9, en excellent état, est sacrifié pour la boucherie *deux mois après l'épreuve.* Son autopsie, faite en présence de M. Bossut, vétérinaire-directeur de l'abattoir de Lille, ne permet de déceler aucune trace de tuberculose, bien que ses ganglions bronchiques et médiastinaux paraissent un peu volumineux et succulents à la coupe.

Groupe VI. — Vaccinés n^{os} 11 et 12. — Témoin n^o 18.

Les deux vaccinés sont éprouvés, en même temps que le témoin, *dix-huit mois après la vaccination.*

Le *témoin* 18 meurt quarante-deux jours après l'inoculation : granulie pulmonaire massive.

Après l'inoculation d'épreuve, le *vacciné* n° 11 fait la réaction thermique immédiate que nous avons précédemment signalée, puis tout rentre dans l'ordre.

Le *vacciné* n° 12 n'a pas fait cette réaction. C'est à peine si, dans les quatre jours qui ont suivi, sa température s'est élevée un peu au-dessus de la normale. Par contre, du treizième au dix-huitième jour, il fait une hyperthermie assez marquée (39°8), puis sa santé redevient parfaite.

Ces deux vaccinés 11 et 12 sont, en raison de leur excellent état d'embonpoint, abattus pour la boucherie *deux mois après l'inoculation virulente*. Leur autopsie a été faite à l'abattoir, en présence de M. Bossut.

Le *vacciné* n° 11 est tout à fait indemne de tuberculose. Ses ganglions bronchiques et médiastinaux sont un peu plus volumineux et plus mous que d'ordinaire.

A l'ouverture de la cavité thoracique du *vacciné* n° 12, on constate que les deux poumons sont incomplètement affaissés. Leur consistance est ferme. La coupe montre le tissu pulmonaire dense, scléreux, partout perméable, mais de teinte un peu pâle. On n'y trouve aucune lésion tuberculeuse. Les ganglions bronchiques et médiastinaux, doublés de volume, sont fermes. Ils contiennent des îlots blancs, grisâtres, entourés d'une zone sanguinolente, presque hémorragique, sans follicules tuberculeux visibles.

Cette dernière autopsie est intéressante à plus d'un titre. On ne peut mettre en doute que, chez cet animal, les lésions de sclérose ganglionnaire et pulmonaire ne soient la conséquence de l'inoculation d'épreuve. Elles indiquent que ce vacciné depuis dix-huit mois est arrivé au délai-limite de sa tolérance vis-à-vis des germes virulents, bien que sa résistance soit encore suffisante pour l'empêcher de contracter une forme de tuberculose granuleuse aiguë telle qu'en montre son témoin.

Les observations de nos deux derniers vaccinés attestent en outre que, si la persistance de la lésion vaccinale locale reflète en quelque sorte l'état de tolérance vis-à-vis des bacilles virulents, cet état de tolérance se prolonge manifestement deux et trois mois après que la lésion vaccinale locale s'est effacée.

Revenons enfin sur une constatation faite sur deux de nos animaux des groupes I et II.

Nous avons déjà dit (1) que, chez les vaccinés *par voie intraveineuse*, nous retrouvions les bacilles d'épreuve, vivants et virulents, dans les ganglions bronchiques, *douze et dix-huit mois après l'inoculation*.

Or, chez nos animaux vaccinés par voie sous-cutanée, nous constatons que, douze mois après l'épreuve chez l'un (n° 1), onze mois après chez l'autre (n° 3), les ganglions bronchiques ne sont plus virulents.

Quelle autre interprétation pourrait-on donner de ce fait si ce n'est que la vaccination sous-cutanée massive confère aux animaux qui y sont soumis une plus grande aptitude à éliminer les bacilles virulents surajoutés, et, conséquemment, qu'elle est plus efficace (en même temps que plus pratique) que l'inoculation vaccinale par voie intraveineuse?

IV. — Principes d'une nouvelle prophylaxie de la tuberculose bovine, basée sur les résultats expérimentaux qui précèdent.

Les faits que nous avons rapportés ci-dessus démontrent, mieux encore que ceux exposés dans nos recherches antérieures, la possibilité de conférer aux jeunes bovins, pour une période de temps qui peut s'étendre à plus d'une année, une résistance manifeste à l'égard de l'infection tuberculeuse, alors même que, de un à quinze mois après la vaccination, cette infection est réalisée de la manière la plus grave, la plus constamment et rapidement mortelle, c'est-à-dire *par voie intraveineuse, avec une dose massive de bacilles très virulents*.

Ils apportent également la preuve de l'innocuité parfaite de notre bacille-vaccin. Ce bacille a perdu toute aptitude à provoquer la formation de tubercules. Il est, même à doses fort élevées, inoffensif pour toutes les espèces animales. Il se comporte dans les organes comme un véritable saprophyte, incapable de récupérer sur place sa virulence. Son élimination éven-

(1) Ces *Annales*, février 1913.

tuelle, par le lait ou par l'intestin, n'offre aucun danger pour l'homme ni pour les autres animaux domestiques ou sauvages. Sa dissémination dans les milieux extérieurs ne peut occasionner aucun dommage.

Ce sont là de précieuses qualités que ne possède aucun des bacilles humains, bovins, équins, aviaires, — tous, à des degrés divers, virulents et tuberculigènes, — dont l'emploi comme vaccins a été proposé par quelques expérimentateurs (Behring, R. Koch et Schütz, Th. Smith, Mac Fadyean, S. Arloing, H. Vallée) et dont la dispersion dans la nature n'est peut-être pas dépourvue d'inconvénients.

Chacun sait, en effet, que l'une des principales raisons qui ont fait écarter jusqu'ici l'emploi de ces bacilles comme « bovo-vaccins » par les éleveurs est la crainte, d'ailleurs fort justifiée, de répandre l'infection tuberculeuse parmi d'autres espèces animales, particulièrement chez l'homme (surtout chez l'enfant), et aussi chez le porc, ou encore chez les petits mammifères rongeurs (rats, souris) et chez les oiseaux qui servent trop souvent de véhicules aux infections d'étables ou de basses-cours (1).

Avec notre *bacille BCG*, rien de semblable ne peut être redouté. Nous avons même d'excellentes raisons de croire (et nous reviendrons ultérieurement sur ce sujet de capitale importance) que sa large utilisation contribuera à raréfier la *tuberculose-maladie* en généralisant, surtout chez les jeunes sujets, l'*infection latente par un bacille vivant, avirulent et non tuberculigène*.

Pour nous, en effet, — nous l'avons affirmé et démontré dès 1906, — l'immunité antituberculeuse (ou si l'on préfère la résistance aux réinfections) est liée à la présence de quelques bacilles peu nombreux et peu virulents dans l'organisme. Tant

(1) Les bacilles normaux, même peu virulents, tués par le chauffage, par les antiseptiques (chlore, iode, formol, fluorure de sodium) ou par immersion prolongée dans la glycérine, dont l'emploi comme vaccin a été également tenté, sont, en général, assez bien tolérés. Nous avons pu constater par de nombreuses expériences, dont quelques-unes sont déjà anciennes (ces *Annales*, avril 1914), que les jeunes bovins, auxquels on injecte de tels bacilles, acquièrent un faible degré de résistance aux infections virulentes d'épreuve, mais cette résistance fléchit très vite et ne saurait être comparée à celle, beaucoup plus solide et relativement durable, que réalisent les bacilles *vivants*. Il en est de même pour les animaux sains auxquels on injecte préventivement, dans la circulation veineuse, de la tuberculine à haute dose, des extraits bacillaires ou des émulsions de lipoides bacillaires.

que celui-ci reste ainsi *parasité*, sans que ce parasitisme entraîne des désordres cellulaires ou fonctionnels graves, les réinfections, — pourvu qu'elles ne soient ni trop fréquentes, ni massives, — n'auront sur lui d'autre effet que d'accroître sa sensibilisation (ou son intolérance) vis-à-vis des corps microbiens bacillaires quels qu'ils soient, vivants ou morts, et vis-à-vis de la tuberculine.

Mais cette immunité cesse dès que la symbiose initiale « vaccinnante » cesse elle-même d'exister, soit que les bacilles vaccinants aient été détruits par les processus normaux de digestion cellulaire, soit qu'ils aient été éliminés par les émonctoires naturels des microbes (bile, intestin, glandes mammaires). Et alors les bacilles virulents de réinfection, s'il en existe déjà qui soient restés intacts, ou s'il en est introduit de nouveaux dans un organisme dont l'immunité est ainsi éteinte, reprennent ou gardent toute leur valeur de bacilles pathogènes, telle qu'ils l'auraient vis-à-vis d'un organisme vierge de toute infection antérieure.

S'agit-il là d'une véritable *immunité*, au sens que les bactériologistes donnent à ce mot, c'est-à-dire d'un état réfractaire à la maladie?

Nous estimons que ce n'est pas niable, car cette immunité est parfaitement analogue à celle que réalisent les virus-vaccins vivants atténués, tels que le vaccin jennérien, le vaccin charbonneux, celui du rouget ou celui de la rage. Elle est, comme celle que déterminent ces virus-vaccins, plus ou moins durable suivant la nature, la quantité et la virulence des germes qui la produisent.

Il serait étrange qu'on exigeât d'un vaccin antituberculeux autre chose que ce qu'on exige d'un vaccin anticharbonneux par exemple, c'est-à-dire d'être *efficace* et *inoffensif*. Chacun sait que l'immunité acquise par la vaccination contre le charbon ou contre le rouget ne dure guère plus d'un an, et que celle acquise par la vaccination jennérienne ou par la vaccination antirabique s'efface peu à peu dans l'espace d'environ sept années. Pourquoi en devrait-il être autrement pour l'immunisation artificielle contre la tuberculose?

Il est seulement vrai que celle-ci se heurte à une difficulté que ne connaissent pas les autres : c'est qu'elle est *difficilement*

applicable, au moins en l'état actuel de la plupart des élevages, *aux sujets adultes*, parce que ceux-ci sont trop souvent et à des degrés divers, déjà tuberculisés ou infectés par *quelques bacilles virulents*. Chez de tels sujets, l'injection de bacilles-vaccins, comme d'ailleurs celle d'autres bacilles virulents ou atténués (ou même morts), détermine un accroissement de la sensibilité à la tuberculine qui est rendue manifeste par l'apparition du « phénomène de Koch ».

Il est donc préférable, pour cette raison, d'instituer méthodiquement la vaccination contre la tuberculose en s'adressant aux tout jeunes sujets, dès les premiers jours qui suivent leur naissance, avant qu'ils aient été exposés à des occasions d'infections abondantes, ou même discrètes, mais répétées, par des bacilles virulents.

*
* *

Telles sont les considérations qui, étayées par nos expériences, nous ont décidés à accepter les généreuses propositions qui nous ont été faites d'essayer les effets préventifs de notre bacille-vaccin BCG dans des exploitations agricoles depuis longtemps gravement infectées de tuberculose.

Dès les premiers jours de 1921, M. Lallemant, préfet de la Seine-Inférieure, mis, à la suite d'une conférence de l'un de nous, au courant de nos recherches, voulut bien nous offrir l'accès d'une des fermes dépendant de son administration. Presque aussitôt après, M. Le Grand, conseiller général du même département, mit à notre disposition son importante exploitation de Gruville.

Avec le concours de l'Office agricole départemental, l'aide précieuse de M. Richart, vétérinaire-directeur du service sanitaire, et de M. Marcel Boissière, vétérinaire à Valmont, nous avons pu entreprendre une importante série d'essais que nous comptons poursuivre pendant plusieurs années consécutives.

Des expériences de même nature ont été commencées plus récemment (janvier 1922) en Seine-et-Oise, grâce à l'obligeance de M. Pierre de Chézelles et au concours de M. Brinet, vétérinaire à Magny-en-Vexin.

Nous adressons à tous ces aimables collaborateurs notre plus reconnaissant merci.

Le problème que nous nous sommes proposé de résoudre était le suivant :

« Dans une exploitation infectée de tuberculose, sans changer quoi que ce soit au mode d'existence ni à l'habitat des animaux, sans modifier les méthodes usuelles d'élevage des jeunes, est-il possible, par le jeu normal des naissances, en vaccinant les nouveau-nés dans les quinze premiers jours de leur vie, et en les revaccinant chaque année, de purger de tuberculose⁽¹⁾ cette exploitation dans un délai de cinq ans ? »

Nous ne pouvons évidemment pas, dès à présent, parler de résultats, en raison même de la forme de la question posée. Mais il n'est pas sans intérêt de faire connaître la marche de nos opérations.

Au début de celles-ci, en janvier et au cours de l'année 1921, nous avions pensé, sans rien connaître des essais effectués par H. Vallée dans un sens un peu différent (mais procédant de la même idée) et qu'il a récemment publiés (2), de créer sous la peau des animaux une lésion locale persistante et active. A cet effet, 28 veaux, nés dans les deux fermes de Seine-Inférieure, ont subi dans le premier mois de leur naissance l'insertion, dans le tissu conjonctif sous-cutané du fanon, d'une bille de pierre ponce de 10 millimètres, chargée, sous le vide, d'une émulsion concentrée de bacilles-vaccins.

Des essais parallèles, effectués au laboratoire, nous ont permis de suivre la destinée des bacilles ainsi immobilisés et protégés. Nous avons pu constater qu'ils se dégradent rapidement et que la résistance des veaux ainsi traités à l'épreuve expérimentale virulente, disparaît très vite, ainsi que leur aptitude à réagir à la tuberculine.

Nous avons donc abandonné cette méthode et, pour ne pas faire perdre à nos 28 veaux le bénéfice de l'immunité partielle qui pouvait leur avoir été conférée par la bille, nous les avons tous vaccinés en 1922, en même temps que 32 autres animaux neufs, nouveau-nés, par inoculation intraveineuse de

(1) Nous entendons par tuberculose la *tuberculose-maladie*, contagieuse et évolutive, entraînant de quelque manière que ce soit des pertes économiques pour l'éleveur. Nous excluons naturellement l'*infection latente*, non manifestée par des lésions folliculaires ou par des tubercules.

(2) *Académie des Sciences*, 2 janvier 1924.

20 milligrammes de BCG, dose dont nous connaissons l'efficacité par nos expériences de 1920 (1).

A partir de janvier 1923, mieux éclairés par les expériences préliminaires qui nous ont suggéré celles qui font l'objet principal de ce mémoire, nous avons employé exclusivement la méthode d'inoculation préventive *par voie sous-cutanée*. Celle-ci a été jusqu'à présent mise en pratique pour la revaccination annuelle de 58 animaux nés en 1921 et 1922 et pour la première vaccination de 48 jeunes, nés au cours de l'année 1923.

Tout ce que nous pouvons actuellement affirmer, c'est que *cette intervention est absolument inoffensive*. A aucun moment les animaux qui l'ont subie dans les quinze premiers jours de leur naissance n'ont éprouvé le moindre malaise. Ils sont tous demeurés en parfaite santé.

Voici, en outre, la preuve que les revaccinations faites à douze mois d'intervalle ne présentent aucun inconvénient :

EXPÉRIENCE. — 4 génisses vaccinées une première fois sont revaccinées un an après. Chez 3 d'entre elles, les traces de l'injection initiale dans le fanon sont encore perceptibles. La réaction locale constatée ne diffère en rien de celle qui a été observée lors de la première inoculation. Aucun des animaux n'a fait de réaction thermique immédiate ou tardive.

En février 1924, dans les exploitations où nous opérons, 142 animaux de un, deux et trois ans, ont été ainsi revaccinés sans incident d'aucune sorte.

Le lecteur se demande peut-être pourquoi nous avons adopté la revaccination *annuelle*, alors que la résistance conférée par une première inoculation se prolonge, d'après nos expériences, au moins jusqu'à dix-huit mois. A ceci nous répondons que, l'opération étant inoffensive, nous croyons préférable de ne pas attendre la limite de son efficacité.

A cette raison on peut ajouter un argument d'ordre psychologique : depuis Pasteur, ceux qui s'adonnent à l'élevage savent qu'ils peuvent, par une vaccination annuelle, préserver leur bétail de quelques-unes des graves maladies qui le décimaient jadis. Il est donc désirable, pour la prévention de la tuberculose, de conserver ce terme passé à l'état d'habitude et de n'apporter ainsi aucun trouble à la vie économique des exploitations agricoles.

(1) Ces *Annales*, septembre 1920.

*
* *

Sous réserve des enseignements complémentaires qui pourront nous être apportés par l'extension de nos essais de vaccination des jeunes bovins contre la tuberculose dans les fermes de Seine-Inférieure et de Seine-et-Oise qui se sont offertes à nous aider dans nos recherches, nous croyons être, dès à présent, fondés à étendre ces expériences dans les centres d'élevage qui disposent de moyens techniques suffisants pour qu'elles puissent être rigoureusement surveillées et suivies.

Il importe, en effet, que les éleveurs soient mis le plus tôt possible en état d'être protégés contre l'infection tuberculeuse bovine par des moyens plus efficaces que ceux, aussi draconiens qu'inopérants, que la législation actuelle en matière de police sanitaire met à leur disposition.

Celle-ci prescrit, il est vrai, l'isolement des animaux tuberculeux ou même réagissant positivement à la tuberculine, mais elle ne pourvoit pas aux moyens de rendre cet isolement complet et réel.

Elle ordonne bien la désinfection des étables contaminées, mais elle est muette sur les mesures à appliquer lorsque cette désinfection est pratiquement impossible en raison de la défectuosité ou de la vétusté des locaux.

Sans doute, les efforts tentés depuis les brillantes campagnes de Bang en Danemark, de Nocard en France, en vue de la prophylaxie de la tuberculose bovine par la tuberculation du bétail ont produit quelques utiles effets. Mais les déceptions des vétérinaires qui ont appliqué systématiquement, avec le plus de soin, la « méthode de Bang » sont devenues nombreuses dans tous les pays, bien que cette méthode ait certainement contribué à réduire notablement la morbidité tuberculeuse. C'est qu'il est arrivé maintes fois que des animaux, reconnus indemnes par l'absence de réaction à la tuberculine, mais provenant d'étables contaminées et qui avaient été introduits dans des milieux où toute contagion intérieure était évitée, ont manifesté cependant, après des temps variables, souvent après un vêlage, une réaction tuberculinique positive. De tels soi-disant « échecs de la méthode de Bang » sont aisément explicables

aujourd'hui que nous savons avec quelle lenteur une infection bacillaire discrète crée parfois la lésion cellulaire symbiotique qui, seule, rend l'organisme qui la porte sensible à la tuberculine. Chez le bovin, comme chez l'homme, *la réaction tuberculeuse peut ne devenir positive que de longs mois, parfois plusieurs années après que la contamination s'est réalisée.*

On ne peut donc pas compter sur la tuberculine pour écarter les sujets suspects. Et, dans ces conditions, il paraît assurément préférable de vacciner tout le cheptel, en commençant par les très jeunes animaux, qui sont beaucoup plus sensibles que les adultes à l'infection bacillaire et auxquels, ainsi que nous l'avons établi, il est possible de conférer une résistance manifeste et suffisamment durable à l'égard des contaminations graves, même artificiellement provoquées.

Conclusions.

En s'adressant aux tout jeunes animaux de l'espèce bovine nés depuis moins de deux semaines, et en leur injectant sous la peau, en plein tissu conjonctif lâche du fanon, une forte dose (50 à 100 milligrammes) de notre bacille modifié par une longue série de cultures successives sur pomme de terre cuite dans la bile de bœuf glycéinée à 5 p. 100 (*Bacille BCG*), on peut les vacciner contre l'infection bacillaire virulente, à ce point qu'ils ne contractent pas la tuberculose si on leur injecte dans les veines, jusqu'au quinzième mois après la vaccination, une dose de bacilles bovins vivants et virulents capable de tuer par granulie aiguë tous les témoins de même âge, en moins de deux mois.

Les jeunes bovins ainsi vaccinés réagissent positivement à la tuberculine pendant tout le temps que leur immunité s'établit. Quelques mois après qu'ils cessent de réagir, cette immunité tend à disparaître et le moment arrive où ils se comportent comme des animaux non vaccinés.

La vaccination par notre bacille BCG est inoffensive, non seulement pour les jeunes bovins et pour les bovidés adultes indemnes de tuberculose, mais aussi pour toutes les espèces animales susceptibles d'être infectées par le bacille tuberculeux.

Ce bacille BCG est complètement privé de virulence. Il a perdu toute aptitude à provoquer la formation de tubercules. Il reste cependant toxique pour l'animal tuberculeux. Les bouillons glycélinés dans lesquels on le cultive renferment de la tuberculine et les organismes auxquels on l'injecte produisent des anticorps décelables par le Bordet-Gengou.

Nous croyons désirable que de plus larges essais de prophylaxie contre la tuberculose du bétail par la méthode que nous avons étudiée soient faits dans quelques grandes exploitations agricoles où une surveillance sanitaire efficace pourrait être régulièrement exercée. Nous sommes tout disposés à faciliter dans ce sens les expériences qu'on voudrait entreprendre.

**ESSAIS DE VACCINATION
CONTRE L'INFECTION TUBERCULEUSE
PAR VOIE BUCCALE
CHEZ LES PETITS ANIMAUX DE LABORATOIRE**

par A. CALMETTE, A. BOQUET et L. NÈGRE.

Depuis l'exposé, fait dans ces Annales (1), de nos recherches sur la vaccination du cobaye et du lapin contre l'infection tuberculeuse expérimentale au moyen du *bacille bilié, avirulent*, et *non tuberculigène*, utilisé par l'un de nous avec C. Guérin pour l'immunisation des jeunes bovins (bacille *BCG*), nous avons poursuivi nos essais et nous avons constaté qu'il est généralement possible de conférer aux rongeurs de laboratoire, par une seule injection massive *sous-cutanée* (20 milligrammes au cobaye, 50 à 100 milligrammes au lapin), comme par une seule injection *intraveineuse* ou intracardiaque (5 milligrammes au cobaye, 20 milligrammes au lapin), une résistance manifeste aux contaminations artificiellement réalisées avec une dose de bacilles virulents d'origine bovine, sûrement capable de tuberculiser les témoins.

Mais nous avons dû nous convaincre que les modes d'épreuve habituellement utilisés par nous, et qui consistent à injecter sous la peau du cobaye, ou dans la veine marginale de l'oreille du lapin un centième ou même un millième de milligramme de bacilles bovins de virulence moyenne, — c'est-à-dire respectivement 400.000 ou 40.000 bacilles — déterminent chez tous les animaux, vaccinés ou non vaccinés, des lésions si étendues et si graves que la résistance des vaccinés finit toujours par être vaincue après une lutte de plus ou moins longue durée. Toutefois leurs lésions présentent un caractère très particulier de « lésions de résistance », circonscrites et à marche lente.

(1) Ces Annales, septembre 1921, p. 561, septembre 1922, p. 625.

Dans ces modes d'épreuve il n'y a rien qui puisse être comparé aux effets d'une contamination naturelle. Or, c'est de ceux-ci qu'il faudrait se rapprocher le plus possible pour apprécier l'efficacité d'une méthode de vaccination sur des animaux qui, l'expérience le prouve, peuvent être sûrement infectés, et contracter une tuberculose mortelle en cinq à huit mois par l'inoculation (intraveineuse au lapin, sous-cutanée au cobaye) de 40 bacilles, soit *un millionième de milligramme* de culture essorée, pesée à l'état frais.

C'est pourquoi nous préférons, surtout chez le cobaye, recourir au procédé si simple et si pratique d'infection par instillation oculaire, proposé et étudié depuis 1913 par l'un de nous avec C. Guérin et V. Grysez (1), qui consiste à laisser tomber sur l'œil de l'animal, — dont un aide tient les paupières légèrement écartées, — une goutte d'émulsion bacillaire (titrée de telle sorte qu'un centimètre cube contienne 1 centigramme de bacilles). Cette méthode ne crée *aucune lésion locale* et elle provoque, avec une parfaite régularité, d'abord la tuberculisation des ganglions du cou, qui deviennent perceptibles au toucher en vingt-cinq à trente jours, puis l'extension lente et progressive du processus tuberculeux aux poumons, ensuite aux viscères abdominaux, amenant la mort le plus souvent en quatre à cinq mois.

Nous croyons cependant, parce qu'un très grand nombre de faits expérimentaux nous l'ont démontré, que *la voie la plus habituelle d'infection tuberculeuse est, pour les animaux comme pour l'homme, le tube digestif* (pharynx, jéjunum et iléon principalement). Il est donc tout indiqué de tenter la vaccination par cette même voie, et d'utiliser également celle-ci pour l'infection artificielle d'épreuve.

C'est ce que nous avons essayé de faire dans la série d'expériences dont nous relatons ci-après les résultats.

*
* *

Bien que nous ayons presque toujours réussi à infecter les cobayes adultes en leur faisant ingérer, à deux ou trois reprises,

(1) *Soc. de Biologie*, 15 février 1913.

à vingt-quatre heures d'intervalle, 0 gr. 02 à 0 gr. 05 de bacilles, soit à la pipette, soit en mélange avec des aliments (pulpe de carottes), — afin d'éviter les petites érosions pharyngées que pourrait provoquer l'emploi de la sonde œsophagienne, — il arrive qu'un petit nombre d'animaux semblent échapper à la contamination parce que les résultats de celle-ci ne se manifestent qu'avec une grande lenteur, souvent après plus de six mois. Malgré la dose massive employée, l'absorption intestinale présente donc, chez l'animal adulte, des irrégularités qui gênent l'expérimentation.

Avec les très jeunes animaux cet inconvénient n'existe pas. Leur intestin est beaucoup plus perméable, non seulement aux microbes, mais aussi, comme l'a jadis montré Ehrlich, aux toxalbumines et aux antitoxines.

Nous nous sommes donc, de préférence, adressé au *jeune cobaye* dans l'expérience que voici :

Expérience. — 36 *jeunes cobayes*, âgés de huit à trente jours, ingèrent à la pipette *six repas* de 10 milligrammes chacun, et *quatre repas* de 20 milligrammes de bacilles BCG, à vingt-quatre heures d'intervalle (1).

Ils sont éprouvés *trois mois après* par ingestion de *deux repas* infectants, chacun de 5 milligrammes de T. bovine Vallée, à

(1) La préparation de nos émulsions de bacilles-vaccins ou de bacilles virulents d'épreuve est faite de la manière suivante :

Sur un petit rectangle de papier-filtre stérile, préalablement taré et placé sur l'un des plateaux d'une balance de précision, on pèse 0 gr. 10 (ou davantage) de culture prélevée avec une spatule de platine.

Ces 10 centigrammes de corps microbiens sont repris sur la spatule et déposés dans un vase conique ou un ballon à fond plat contenant de petites billes de verre et préalablement stérilisé.

On agite d'abord un court instant pour dissocier la culture, puis on introduit dans le vase, avec une pipette stérile, et par petites portions en agitant constamment, une quantité déterminée d'eau salée physiologique stérile, 40 cent. cubes par exemple.

Lorsque l'émulsion est bien homogène et ne paraît plus renfermer de grumeaux, on la verse dans un verre conique stérile et on l'utilise aussitôt pour les inoculations ou ingestions. Chaque centimètre cube de l'émulsion ainsi préparée contient 1 centigramme, soit environ 400 millions de bacilles.

Il est, dès lors, aisé d'en faire des dilutions telles qu'un centimètre cube corresponde à 1 milligramme, à 0 milligr. 1, etc..., en reportant successivement 1 cent. cube de la dilution initiale dans un petit ballon contenant 9 cent. cubes d'eau salée physiologique, puis (après avoir bien agité) 1 cent. cube de cette seconde dilution dans un second ballon identique, etc... On peut ainsi faire des dilutions telles que 1 cent. cube ne renferme plus que 40, ou même seulement 4 bacilles. Cette technique ne présente aucune difficulté.

vingt-quatre heures d'intervalle, en même temps que six témoins qui sont tous morts entre soixante-dix et cent dix jours avec des lésions de tuberculose généralisée à tous les viscères de la cavité splachnique et aux poumons.

Parmi les vaccinés :

1 meurt le trentième jour sans lésions tuberculeuses (pasteurellose).

1 succombe le quarantième jour (de pasteurellose également) avec des ganglions mésentériques volumineux, sans autre lésion.

11 meurent du soixante-dixième au quatre-vingt-dixième jour (pasteurellose) avec adénites mésentériques et quelques petits tubercules sur la rate. *Trois* d'entre eux ont de rares tubercules pulmonaires translucides.

12 meurent du cent-dixième au cent-trentième jour, avec adénites mésentériques. *Six* d'entre eux n'avaient pas d'autres lésions. *Quatre* présentaient un ou deux petits tubercules sur la rate. *Deux* avaient des lésions de tuberculose étendues aux poumons et à la rate.

4 meurent du cent-quarantième au cent-cinquantième jour, dont *un* avec adénites mésentériques sans autres lésions et *trois* avec tuberculose généralisée.

7 survivants sont sacrifiés le deux cent-septième jour après l'épreuve. Tous ont de l'adénite mésentérique. *Deux* n'ont pas d'autre lésion. *Un* a de la tuberculose généralisée et les *quatre* autres ne montrent que de rares petits tubercules sur les organes viscéraux.

Il est donc évident que l'ingestion préalable de bacilles-vaccins a permis aux jeunes cobayes de résister longtemps (pour quelques-uns pendant plus de six mois) à l'infection artificielle d'épreuve réalisée dans des conditions d'exceptionnelle gravité.

Il est très probable que, si cette infection d'épreuve avait été plus discrète, la plupart des cobayes auraient résisté bien davantage.

Une expérience analogue a été faite sur des *jeunes lapins* :

Expérience. — *12 jeunes lapins*, âgés de quinze à vingt et un jours, ingèrent à la pipette *dix repas*, chacun de 20 milli-

grammes de bacilles-vaccins, à vingt-quatre heures d'intervalle. Ils sont éprouvés trois mois plus tard par *deux repas infectants* de 10 milligrammes de T. bovine Vallée, en même temps que 3 témoins.

L'un des témoins est sacrifié le soixante-dixième jour. Son autopsie montre une adénite mésentérique et quelques granulations à centre caséux sur l'intestin grêle.

Un second témoin est sacrifié le cent-vingtième jour : adénite mésentérique volumineuse et tubercules disséminés à la surface des deux poumons.

Le troisième témoin est sacrifié le cent-trentième jour : adénite mésentérique, nombreux tubercules sur l'intestin grêle (iléon surtout), gros foyers caséux sur le poumon droit et quelques tubercules sur le poumon gauche.

Parmi les vaccinés :

6 sont sacrifiés le cent-trentième jour, en très bon état. Deux ont une adénite mésentérique scléreuse, moins prononcée que chez les témoins, et quelques rares granulations sur l'intestin grêle. Trois présentent les mêmes lésions avec, en plus, un petit tubercule sur un poumon. Le sixième a quelques petits tubercules du volume d'un grain de millet sur les deux poumons.

Les six survivants, restés également en parfait état, sont sacrifiés à la fin du sixième mois après l'épreuve. Tous ont une adénite mésentérique *scléreuse*. Trois n'ont pas d'autre lésion ; trois ont quelques rares tubercules sur les poumons.

L'absorption — répétée plusieurs fois — de bacilles biliés par la voie buccale est donc susceptible de conférer aux jeunes cobayes et aux jeunes lapins une résistance considérable aux infections massives artificiellement réalisées par la même voie.

Il est probable que cette résistance serait encore plus nettement accusée vis-à-vis des infections naturelles, mais la preuve en est difficile à faire avec les petits animaux de laboratoire qui se contaminent rarement, même par contact prolongé dans les cages, et chez lesquels l'immunité acquise est de courte durée vis-à-vis de la plupart des virus.

C'est pourquoi nous avons prié M. Wilbert, qui dirige l'Institut Pasteur de Kindia, en Guinée (Afrique occidentale française), d'entreprendre une série d'expériences sur des singes

de diverses espèces, y compris des anthropoïdes (chimpanzés), en vue d'établir si la vaccination antituberculeuse par ingestion au moyen du bacille *BCG* protège efficacement, et pour une durée pratiquement suffisante, les singes sains vivant en cohabitation étroite avec des singes de mêmes espèces artificiellement contaminés. Nous en ferons connaître ultérieurement les résultats.

RECHERCHES SUR L'IMPORTANCE DU ZINC DANS L'ALIMENTATION DES ANIMAUX EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS (1)

par GABRIEL BERTRAND et BOJE BENZON

L'étude biologique du zinc a fait de grands progrès depuis une vingtaine d'années. Non seulement elle a permis de démontrer la présence constante du métal dans l'organisme des plantes [1], mais encore, plus récemment, dans celui des animaux [2]. Il y a même déjà lieu d'admettre, en ce qui concerne ces derniers, l'intervention du zinc dans plusieurs phénomènes physiologiques : l'un, particulier, est l'envenimation par la morsure des serpents [3]; l'autre, d'ordre très général, est celui de la fécondation [4].

En outre, lorsqu'on examine les variations de la teneur en zinc des jeunes animaux avec la croissance, on observe un parallélisme si remarquable entre ces variations et celles que Bunge a découvertes autrefois au sujet du fer [5], que l'on est conduit à attribuer au premier de ces métaux un rôle aussi important qu'au second dans les échanges nutritifs et le développement général de l'individu [6]. Nous avons cherché s'il était possible de mettre directement ce rôle du zinc en évidence. Malgré les difficultés à résoudre, nous avons été assez heureux pour y parvenir, comme on va le voir, en opérant sur la souris.

Nos expériences ont consisté à comparer deux lots de souris d'une même portée, nourris, l'un avec des aliments débarrassés de zinc, l'autre avec les mêmes aliments additionnés d'une quantité connue et très petite de ce métal. Si l'on se rappelle qu'une souris adulte ne renferme pas plus de quelques dixièmes de milligramme de zinc, dont un dixième environ est déjà

(1) Un résumé de ce travail a été publié dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 175, 1922, p. 289.

apporté à la naissance [7], que ses besoins en métal sont, par conséquent, très petits, on comprendra que la première difficulté que nous ayons eu à résoudre ait été de préparer des aliments assez purs pour ne pas fournir de zinc au lot carencé pendant la durée d'une expérience.

Une telle purification a entraîné comme conséquence la soustraction à peu près totale de ces facteurs alimentaires, de nature inconnue, que l'on désigne de différentes manières, en particulier, sous le nom de vitamines. Or, nous ne pouvions pas ajouter certains de ces facteurs aux aliments purifiés sans introduire, en même temps, une quantité appréciable de zinc. Le son (de blé ou de riz), relativement riche en vitamine B, est la partie du grain qui contient le plus de métal; la levure de bière et son extrait aqueux, considérés comme de très bonnes sources de la même vitamine, ont aussi des teneurs en zinc remarquablement élevées.

Il en est de même des sources d'origine animale. Le foie, le cerveau, le cœur, qui renferment des vitamines en assez grande proportion, sont parmi les organes les plus riches en zinc.

L'huile de foie de morue et le beurre de vache, bien connus par leur richesse à la fois en vitamine A et en vitamine B, contiennent aussi de notables proportions de zinc. Nous avons trouvé, en moyenne, 6 milligrammes de ce métal par kilogramme d'huile de foie de morue et jusqu'à 8 milligr. 2 par kilogramme dans le beurre de vache. Nous avons pensé débarrasser le beurre du zinc qu'il renferme en l'agitant après fusion avec de l'acide chlorhydrique dilué à 1 p. 100, mais ce traitement n'a pas donné le résultat que nous attendions.

Nous avons donc dû nous résoudre à soumettre les animaux à un régime particulièrement carencé, avec tous les risques de terminaison fatale qu'il comporte. En fait, après une durée variable, les souris sont mortes, quel que soit le lot auquel elles appartenaient, avec les mêmes symptômes de paralysie progressive ascendante que l'on observe lorsqu'on expérimente avec les régimes dépourvus de vitamines. Heureusement, malgré cette nouvelle difficulté, le but que nous poursuivions a pu être nettement atteint.

CHOIX ET COMPOSITION DES ALIMENTS.

Les souris s'accommodent très longtemps d'un régime formé de grains de froment et d'eau. Nous avons pris ce régime comme type et nous avons constitué un mélange dans lequel les principales substances nutritives, notamment celles que l'on range aujourd'hui [8] dans les groupes des glucides, des lipides et des protides, existent, avec les sels et le lest intestinal, à peu près dans les mêmes proportions que dans le grain du froment. Ce mélange avait la composition suivante :

	EN GRAMMES
Fécule de pomme de terre	73
Caséine	13
Cellulose	5
Lactose	2,50
Beurre de coco	2,50
Lactate de calcium (+ 5 H ² O)	2,60
Phosphate monopotassique	0,30
Phosphate bisodique cristallisé	0,75
Chlorure de calcium anhydre	0,40
Sulfate de magnésium cristallisé	0,250
Alun ferricoammonique	0,020
Alun aluminopotassique	0,004
Fluorure de sodium	0,004
Sulfate de cuivre	0,002
Sulfate de manganèse	0,002
Iodure de potassium	0,0005
Bromure de potassium	0,0005

La fécule de pomme de terre a été choisie, parmi d'autres matières amylacées, pour une raison d'ordre pratique; ses grains, plus gros que ceux de blé ou de riz, se déposent plus vite dans les liquides de lavage, ce qui permet de diminuer la durée, malgré cela encore longue, de leur purification.

La caséine a été employée de préférence au gluten et à d'autres protides aussi à cause de la facilité relative de sa purification. Elle est, en outre, par sa composition en acides aminés, parmi les meilleures substances du groupe que l'on puisse donner aux jeunes animaux.

La cellulose a été prise sous la forme de papier à filtre. C'est aussi à cause de la possibilité de l'obtenir assez facilement

exemple de zinc que nous l'avons préférée à d'autres substances non digestibles comme lest ou ballast intestinal.

Nous avons mentionné plus haut la présence, dans le beurre de vache, d'une petite proportion de zinc que des lavages à l'acide chlorhydrique étendu n'avaient pas réussi à éliminer. Le beurre de coco que nous avons utilisé comme matière grasse n'avait pas cet inconvénient : il ne nous avait pas donné trace de zinc à l'analyse, en opérant sur un échantillon de 100 grammes.

Comme on peut s'en rendre compte par le calcul, le lactate de calcium a été introduit dans le mélange nutritif en quantité assez grande pour saturer les acides sulfurique et phosphorique qui résultent de la destruction de la caséine au sein des tissus et pour couvrir en même temps les besoins du squelette.

Au lieu de phosphates tribasiques de calcium et de magnésium préparés d'avance, dont l'assimilabilité aurait pu être insuffisante, nous avons employé du chlorure de calcium et du sulfate de magnésium en quantités convenables pour fournir, par double décomposition avec les phosphates de potassium et de sodium, au sein même du mélange alimentaire, des phosphates gélatineux.

Les deux métaux alcalins ont été introduits dans la proportion où ils se trouvent dans le corps entier de la souris, d'après les analyses de P. Gérard [9].

Nous n'avons pas cru nécessaire d'ajouter de combinaison du silicium, estimant que la quantité de silice contenu à l'état normal dans la fécule devait être suffisante. Nous n'avons pas non plus ajouté de combinaisons du bore et de l'arsenic, dont il n'y a dans l'organisme des animaux que des traces infinitésimales, étant presque sûrs qu'il en resterait assez dans les substances organiques après les traitements auxquels nous les avons soumises.

PURIFICATION DES ALIMENTS.

FÉCULE DE POMME DE TERRE. — La fécule dont nous nous sommes servis ne renfermait, telle que nous l'avons trouvée dans le commerce, qu'une très faible proportion de zinc, 1 mil-

ligramme par kilogramme. Nous l'en avons complètement débarrassée, en la traitant de la manière suivante : chaque portion de 500 grammes de fécule a été agitée, dans un flacon de 2 litres, à l'aide d'une machine, avec 1 litre 1/2 d'acide chlorhydrique à 1 p. 100. Dans cette opération, comme dans les suivantes, l'acide avait été purifié par nous et l'eau redistillée préalablement dans un appareil en verre, sous pression réduite.

Après une heure d'agitation, on a placé le flacon debout et laissé déposer la fécule, jusqu'au lendemain. On a décanté le liquide surnageant, un peu trouble et coloré en jaune par du fer, et l'on a répété l'opération, au moins quatre fois. On a vérifié que les dernières eaux acides décantées, parfaitement limpides et incolores, ne renfermaient plus trace de zinc, et l'on a soumis la fécule à quatre nouveaux lavages, avec de l'eau seule. Pour éliminer ce qui restait d'acide chlorhydrique, on a agité une fois avec de l'eau assez ammoniacale pour bleuir encore nettement le tournesol après décantation, et quatre à cinq fois avec de l'eau seule. On a déshydraté la fécule purifiée par deux ou trois agitations avec de l'alcool fort, redistillé, comme l'eau, dans un appareil en verre sous pression réduite. Enfin, on a placé le produit dans une cuvette en porcelaine et, après avoir recouvert soigneusement de papier à filtre, on a séché dans une étuve, à une douce température. Un essai sur 100 grammes de cette fécule n'a pas permis de déceler le zinc.

CASÉINE. — Elle a été préparée directement à partir du lait. Celui-ci provenait des étables de l'Institut Pasteur et renfermait environ 4 milligrammes de zinc par litre. On l'a traité par portions de 2 litres à la fois.

Le lait, déjà débarrassé de la plus grande partie de sa crème à la machine, a été centrifugé à fond pendant une heure. On a séparé la pellicule presque solide de crème et décanté la couche de lait que l'on a filtrée à travers un filtre Chardin, préalablement mouillé avec de l'eau, pour retenir les derniers globules de beurre.

Les pots en verre de la centrifuge, ayant été nettoyés du dépôt, principalement cellulaire, qui s'y trouvait, on y a

reversé le lait filtré; on a ajouté goutte à goutte de l'acide acétique étendu, en remuant constamment avec une baguette, pour précipiter la caséine, puis on a centrifugé. Après décantation du sérum, le précipité a été trituré, dans les pots mêmes, avec de l'eau ajoutée peu à peu, de manière à éviter la formation de grumeaux. La pâte homogène et semi-liquide a été délayée dans l'eau acidulée par l'acide acétique, jusqu'à ce que les pots soient presque pleins; on a bien agité, puis centrifugé et décanté.

Après trois lavages semblables, le précipité a été mis encore une fois en suspension dans l'eau; on l'a additionné, à l'état de pâte semi-liquide, et en remuant, d'une quantité d'ammoniaque suffisante pour redissoudre la caséine, on a dilué avec de l'eau jusqu'à remplissage des pots, et l'on a filtré la solution opalescente ainsi obtenue à travers un filtre mouillé. De la solution limpide, la caséine a été reprécipitée par l'acide acétique, lavée à l'eau acidulée, déshydratée par plusieurs passages à l'alcool, lavée une fois à l'éther, enfin séchée, comme il a été indiqué plus haut pour la fécule.

Cette caséine offrait l'aspect d'une poudre légère, parfaitement blanche, dans laquelle nous n'avons pas trouvé de zinc en opérant sur 100 grammes.

CELLULOSE. — Nous sommes partis de papier à filtre dans lequel l'analyse nous a révélé la présence de quantités appréciables de fer, de cuivre et de zinc. Un dosage de ce dernier a fourni le chiffre de 6 milligrammes de métal par kilogramme.

La purification n'a présenté aucune difficulté. Le papier a été traité comme la fécule de pomme de terre, mais au lieu de laisser déposer spontanément la pulpe de cellulose pour décanter le liquide de lavage, nous l'avons essorée à l'aide d'un entonnoir en porcelaine, ce qui a singulièrement abrégé la durée totale de l'opération. On a pris soin, surtout à la fin, de ne pas essorer trop fortement, afin d'obtenir une cellulose peu compacte, facile à défibrer.

LACTOSE. — Le lactose du commerce, préparé par évaporation du petit-lait et simple cristallisation, contient toujours du zinc. Pour le purifier, on a dissous le produit commercial par

portions de 500 grammes, dans 10 fois son poids d'eau. La solution a été alcalinisée légèrement par l'ammoniaque et saturée par l'hydrogène sulfuré. Après vingt-quatre heures de repos dans un flacon bouché, on a filtré, concentré le liquide par distillation dans le vide jusqu'à consistance de sirop clair, filtré de nouveau en se servant cette fois d'un entonnoir à filtration chaude, pour séparer un peu de soufre, et abandonné sous cloche à la cristallisation. Le lactose, essoré à la trompe, a été redissous à chaud, et recristallisé plusieurs fois. A ce moment l'analyse y a vérifié, comme dans les substances précédentes, l'absence complète du zinc.

LACTATE DE CALCIUM. — On a dissous du lactate de calcium commercial dans l'eau, filtré, ajouté à la solution un peu d'ammoniaque et du lait de chaux. On a porté le mélange à l'ébullition, que l'on a maintenue jusqu'à disparition complète des vapeurs ammoniacales, comme dans une précipitation de zinc à l'état de zincate de calcium. Après refroidissement et filtration, on a saturé la chaux dissoute par l'acide carbonique. Enfin, le liquide a été filtré, concentré et mis à cristalliser.

CHLORURE DE CALCIUM. — Ce sel a d'abord été traité comme le lactate, mais, après la séparation du précipité calcique, la solution alcaline a été neutralisée exactement par l'acide chlorhydrique et, au lieu d'être concentrée à cristallisation, elle a été titrée par un dosage à l'argent.

AUTRES SELS. — A l'exception des fluorure, bromure et iodure alcalins, les autres sels avaient été préparés antérieurement par l'un de nous au cours de recherches sur le rôle du zinc et celui du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. Leur mode de préparation a été publié en même temps que l'exposé de ces recherches [10].

FABRICATION DES PAINS.

Nous avons présenté le mélange d'aliments purifiés aux souris sous la forme de petits pains cuits au four, c'est-à-dire sous la forme solide et même dure, plutôt qu'en poudre ou en

pâte, parce qu'il nous a paru que cela était plus conforme aux besoins et aux habitudes de nos petits rongeurs. En fait, les souris les ont presque toujours grignotés, du moins selon les apparences, avec un réel plaisir.

La forme de pains a, d'autre part, rendu possible la récolte des débris non utilisés par les animaux en vue de l'établissement des consommations journalières.

Voici comment nous avons procédé pour la fabrication des petits pains. Les sels ont d'abord été répartis en trois solutions : la première, contenant le chlorure et le lactate de calcium ; la deuxième, les phosphates et les halogénures alcalins ; la troisième, les divers sulfates.

La cellulose a été imbibée ensuite, dans un mortier de porcelaine, avec le lactose dissous dans un peu d'eau. Au mélange à peu près homogène, on a ajouté la caséine, puis, par petites portions et en triturant bien, la fécule de pomme de terre. On a obtenu ainsi une masse sèche et pulvérulente que l'on a malaxée avec le beurre de coco et dans laquelle on a introduit successivement les trois solutions salines. Enfin, toujours en triturant, assez d'eau pour former une pâte pilulaire. Celle-ci a été façonnée en petites boules que l'on a disposées et légèrement comprimées sur un plat de porcelaine et fait cuire dans un four à moufle, convenablement chauffé. Après la cuisson, qui n'a demandé guère plus de six minutes, on a séché presque complètement les pains à l'étuve. Ils pesaient alors environ 2 grammes et contenaient approximativement 10 p. 100 d'eau. On les fabriquait par portions de 100 à 300 grammes et on les conservait dans des flacons bouchés à l'émeri, placés à la glacière.

CONDUITE DES EXPÉRIENCES.

Les souris destinées aux expériences ont été séparées de leur mère au moment du sevrage, c'est-à-dire à l'âge d'environ trois semaines. A ce moment, leur teneur relative en zinc devait avoir atteint son minimum. On a pesé les jeunes animaux et on n'a utilisé, d'une même portée, que ceux ayant à peu près le même poids [11]. Chaque portée a donné lieu à une expérience particulière.

Les souris pesées ont été placées isolément dans des

bocaux B (fig. 4), munis d'un couvercle de verre. Il ne fallait pas employer de cages en bois ou en fer galvanisé, comme celles ordinairement en usage dans les laboratoires, parce que les animaux auraient pu, en les grignotant, fausser les résultats. Les bocaux avaient un peu plus de 2 litres de capacité (diamètre = 13 centimètres, profondeur = 17 centimètres) ; ils étaient garnis, au fond, d'un disque *d* de papier filtre et d'un lit *c* de coton, l'un et l'autre exempts de zinc. Les couvercles C étaient perforés pour les besoins de la respiration (9 trous de 8 millimètres). Une sorte de pipette P servait de réservoir d'eau ; sa tige passait librement à travers le trou central du couvercle et, à frottement, à travers un bouchon de liège *b*, placé à l'extérieur, qui la maintenait en place. On la remplissait par immersion du réservoir dans un verre d'eau pure, puis on fermait l'extrémité libre de la tige avec un petit bouchon ; l'animal s'abreuvait en léchant la partie inférieure du réservoir *r*, munie d'une petite ouverture, tandis que l'air rentrait bulle à bulle pour remplacer le liquide absorbé.

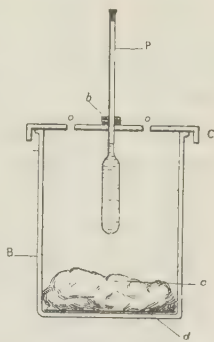


FIG. 4.

On a divisé les animaux en deux lots aussi égaux que possible quant au nombre, au poids et au sexe des individus. Lorsque, après triage des souris de poids à peu près égaux, il ne restait dans une série qu'un nombre impair d'individus et qu'un des lots devait, en conséquence, renfermer un individu de plus que l'autre, on en tenait compte, pour l'ensemble des résultats, en faisant la compensation à l'une des séries suivantes.

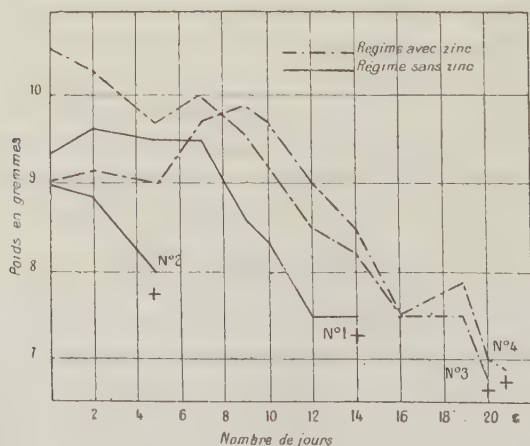
Chaque souris a reçu à discrétion des petits pains et de l'eau pure. Les petits pains étaient grossièrement fragmentés pour en faciliter l'usage aux jeunes animaux. Tous les jours ou tous les deux jours, on en recueillait les débris en changeant la litière, et l'on pouvait déterminer ainsi, à quelque chose près, ce qui avait été consommé. Comme il aurait pu apparaître des algues dans l'eau de boisson, à cause des substances apportées par la salive des animaux et par les parois du réservoir de verre, on a pris la précaution de chauffer de temps en temps

les pipettes en les plongeant quelques minutes dans un tube d'eau bouillante.

Tandis que les souris du premier lot de chaque série recevaient des petits pains composés suivant la formule donnée au commencement de ce mémoire, celles du second lot étaient nourries avec des petits pains contenant, en plus des substances énumérées, une dose de 0 gr. 010 de sulfate de zinc cristallisé, dose correspondant à 2 milligrammes de zinc pour 100 grammes de petits pains, à 10 p. 100 d'eau. C'est à peu près la teneur en zinc que nous avons trouvée dans les grains de froment et d'avoine qui servaient à la nourriture habituelle des animaux du laboratoire.

Nous avons expérimenté sur 23 souris, provenant de cinq portées. Ces cinq portées étaient issues de races et de familles différentes. Une de ces souris (n° 9) est morte après deux jours sans avoir pris de nourriture; une autre, atteinte d'acariose (n° 5), a été supprimée par prudence; une troisième (n° 16), enfin, a présenté un caractère si exceptionnel que nous reviendrons plus tard à son sujet. Il est donc resté 20 souris, divisées en cinq séries, d'après le nombre des portées.

Voici, résumés à l'aide de tableaux et de graphiques, les résultats obtenus :



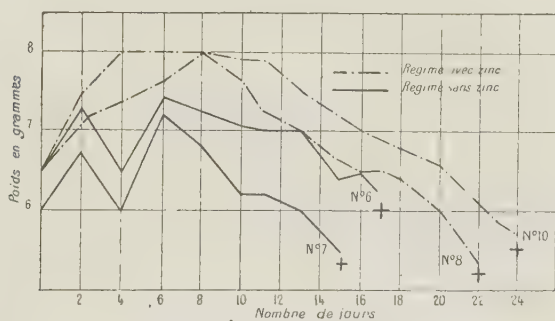
Graphique de la série A.

Série A. — Débutant le 5 avril, avec des souris grises nées le 10 mars :

	POIDS DES SOURIS en grammes		ALIMENT consommé en grammes	SURVIE en jours
	au début	à la mort		
Sans zinc, n° 1 (femelle) . . .	9,35	7,50	24,60	14
Sans zinc, n° 2 (mâle)	9,00	8,00	9,75	5
Avec zinc, n° 3 (mâle)	10,55	6,25	33,80	20
Avec zinc, n° 4 (femelle) . . .	9,05	6,90	35,20	21

Série B. — Débutant le 18 avril, avec des souris blanches nées le 24 mars :

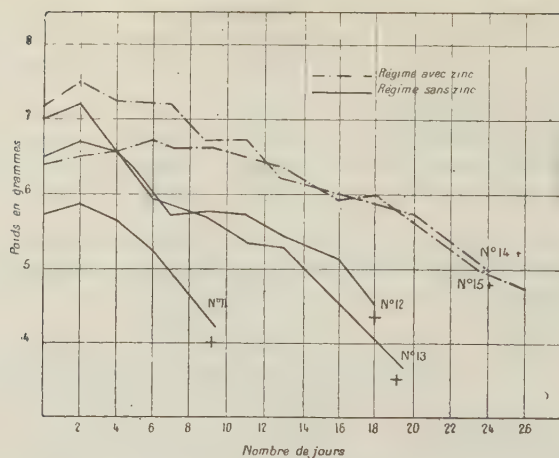
	POIDS DES SOURIS en grammes		ALIMENT consommé en grammes	SURVIE en jours
	au début	à la mort		
Sans zinc, n° 6 (mâle)	6,50	6,20	30,00	17
Sans zinc, n° 7 (mâle)	6,00	5,50	29,65	15
Avec zinc, n° 8 (femelle) . . .	6,50	5,35	32,50	22
Avec zinc, n° 10 (mâle)	6,50	5,70	34,65	24



Graphique de la Série B.

Série C. — Débutant le 13 mai, avec des souris blanches d'un autre élevage nées le 20 avril :

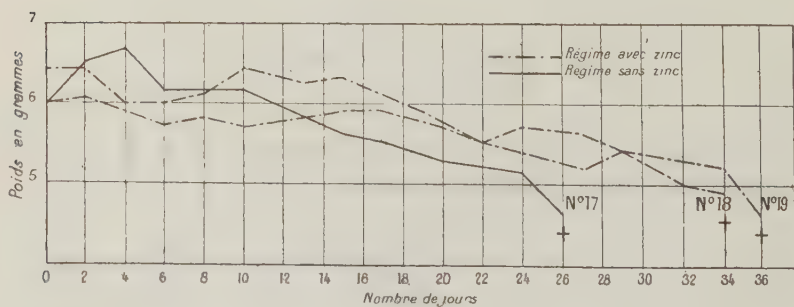
	POIDS DES SOURIS en grammes		ALIMENT consommé en grammes	SURVIE en jours
	au début	à la mort		
Sans zinc, n° 11 (sexe indécié). .	3,75	4,30	4,00	9
Sans zinc, n° 12 (mâle)	6,50	3,75	12,20	19
Sans zinc, n° 13 (femelle) . . .	7,00	4,45	12,00	18
Avec zinc, n° 14 (mâle)	7,20	5,00	19,90	24
Avec zinc, n° 15 (femelle) . . .	6,40	4,70	17,90	26



Graphique de la série C.

Série D. — Débutant le 23 mars, avec des souris blanches du dernier élevage nées le 2 mai :

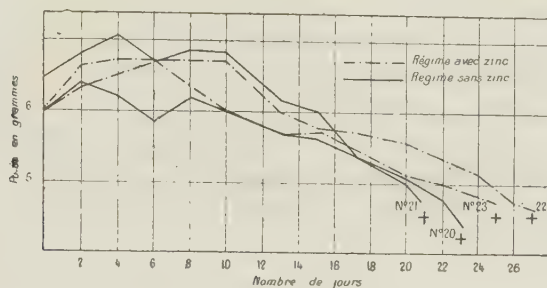
	POIDS DES SOURIS en grammes		ALIMENT consommé en grammes	SURVIE en jours
	au début	à la mort		
Sans zinc, n° 17 (mâle) . . .	5,90	4,70	20,10	26
Avec zinc, n° 18 (mâle) . . .	6,40	4,80	28,05	34
Avec zinc, n° 19 (mâle) . . .	5,90	4,60	21,50	36



Graphique de la série D.

Série E. — Débutant le 23 mai, avec des souris blanches du dernier élevage nées le 2 mai :

	POIDS DES SOURIS en grammes		ALIMENT consommé en grammes	SURVIE en jours
	au début	à la mort		
Sans zinc, n° 20 (femelle) . .	6,00	4,40	14,40	23
Sans zinc, n° 21 (femelle) . .	6,0	4,70	17,40	21
Avec zinc, n° 22 (femelle) . .	6,05	4,60	19,80	27
Avec zinc, n° 23 (mâle) . . .	6,00	4,70	17,65	25



Graphique de la série E.

La démonstration qui découle de ces expériences est très nette. L'examen, série par série, de tous ces résultats montre, en effet, que les animaux ayant trouvé du zinc dans leur alimentation ont vécu plus longtemps que ceux n'ayant disposé que de matières nutritives débarrassées de ce métal. Leur survie, comptée à partir du moment où ils ont été soumis au régime des aliments synthétiques, a été de 25 à 50 p. 100 plus longue que celle des animaux sans zinc.

Il nous a paru nécessaire, en vue de compléter la démonstration, de rechercher si le zinc avait été réellement assimilé. Dans ce but, nous avons mis de côté, au fur et à mesure de leur mort, les animaux en expérience, puis nous y avons dosé le zinc par la méthode au zincate de calcium [42]. Comparativement, nous avons dosé le zinc dans des souris appartenant aux mêmes familles, soit au moment du sevrage, soit après quelques semaines d'alimentation normale.

Les résultats de ces dosages, contenus dans le tableau suivant :

	AGE approximatif en semaines	NOMBRE de souris analysées	POIDS total frais	POIDS moyen d'une souris	ZINC trouvé en milligr.	ZINC en moyenne par souris
<i>Souris en expérience.</i>						
Régime sans zinc. Série A.	5	2	15,50	5,20	0,4	0,15
— Série B.	5	3	18,50		0,6	
— Série C.	6	2	8,20		0,2	
— Série D.	7	1	4,70		0,1	
— Série E.	6	2	5,40		0,2	
Régime avec zinc. Série A.	6	2	13,15	5,32	0,5	0,28
— Série B.	6	3	16,95		0,8	
— Série C.	6	2	9,70		0,7	
— Série D.	8	1	4,80		0,2	
— Série D.	8	1	4,60		0,3	
— Série E.	7	2	9,30		0,6	

Souris témoins.

Non sevrées	3	4	17,30	5,71	0,5	0,16
Non sevrées	3	3	22,70		0,6	
Sevrées. Régime normal .	6	3	39,80	12,27	1,0	0,35
— — .	7	4	43,70		1,3	
— — .	7	3	39,20		1,2	

font ressortir : 1° que les animaux soumis à la carence de zinc ont retenu ce métal avec énergie; c'est à peine si l'on peut dire que la quantité de zinc contenue dans leur organisme ait diminué (0 milligr. 15 au lieu de 0 milligr. 16); 2° que les animaux nourris avec les aliments synthétiques additionnés de zinc ont assimilé une partie de celui-ci; la quantité totale de zinc a presque doublé (0 milligr. 28 au lieu de 0 milligr. 15 en moyenne). Comparativement, chez la souris soumise au régime normal et dont le poids était plus élevé, la quantité de zinc a passé en moyenne de 0 milligr. 15 à 0 milligr. 35.

CONCLUSIONS.

Le zinc s'est comporté, dans les expériences d'alimentation synthétiques sur la souris, comme un élément de grande importance physiologique. Chez les animaux soumis à un régime alimentaire complètement débarrassé de zinc, l'organisme a retenu avec une grande énergie la petite provision de métal qu'il renfermait au commencement des expériences;

chez ceux qui ont été nourris avec les mêmes aliments additionnés d'une proportion minime de zinc, comparable à celle que l'on rencontre dans les aliments naturels, il y a eu résorption d'une quantité de métal assez grande pour que la provision primitive ait été à peu près doublée. Enfin, dans chaque série d'expériences, les animaux qui ont trouvé du zinc dans leur alimentation ont vécu plus longtemps que ceux qui n'en ont pas trouvé. L'importance du métal a été telle qu'un dixième et demi à trois dixièmes de milligramme, ingérés pendant la durée totale de l'expérience, ont suffi à prolonger cette durée de 25 à 50 p. 100. Il n'est pas encore possible d'affirmer, mais il semble bien probable que, si d'autres facteurs de croissance n'avaient pas fait défaut, ces résultats auraient encore été dépassés.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] M. JAVILLIER. *Ces Annales*, t. 22, 1908, p. 720, et *Thèse doct. sc. nat.*, Paris, 1908.
- [2] On trouvera la bibliographie de cette partie de la question dans Gab. BERTRAND et R. VLADESCO. *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. 29, 1921, p. 53 et t. 33, 1923, p. 341. Aux indications données, ajouter : van ITALLIE et van ECK. *Archiv d. Pharmaz.*, t. 251, 1913, p. 50. M. BODANSKY. *J. biol. chem.*, t. 48, 1921, p. 361 et *C. R. Ac. Sc.*, t. 173, 1921, p. 790.
- [3] C. DELEZENNE. *Ces Annales*, t. 33, 1919, p. 68, et *Thèse doct. sc. nat.*, Paris, 1919.
- [4] Gab. BERTRAND et R. VLADESCO. *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. 31, 1922, p. 796 et t. 33, 1923, p. 341.
- [5] *Cours de Chimie biol. et pathol.*, 1891.
- [6] Gab. BERTRAND et R. VLADESCO. *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. 29, 1921, p. 915.
- [7] Gab. BERTRAND et R. VLADESCO. *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. 29, 1921, p. 736.
- [8] *Compte rendu 4^e Conférence int. Chim.*, Cambridge, 1923, et *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. 33, 1923, p. 1313.
- [9] *Thèse sc. nat.*, Paris, 1912.
- [10] Gab. BERTRAND. *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. 41, 1912, p. 400 et 494.
- [11] Pour les pesées, on mettait les souris dans un gobelet de verre muni d'un couvercle, afin de les empêcher de fuir et d'éviter toute contamination chimique.
- [12] Ayant servi dans presque toutes les recherches citées plus haut.

SUR LA FORMATION DES ANTICORPS A LA SUITE DES INJECTIONS DE MALLÉINE CHEZ LE MULET

par BROCC-ROUSSEU, FORGEOT et A. URBAIN.

Si l'unanimité des auteurs reconnaît la grande valeur de la réaction à la malléine pour le diagnostic de la morve chez le cheval, il n'en est pas de même lorsqu'il s'agit du mulet.

W. M. Scott (1) a enregistré de nombreuses défaillances de la malléine dans des cas de morve du mulet. Pour lui, l'injection de malléine n'est pas un moyen aussi sûr de diagnostic, chez le mulet, que chez le cheval. Cabayé, Colle et Lamarque (2) ont constaté que, chez le mulet, l'intradermo-malléination palpébrale donne assez rarement des réactions positives. Aux dires de ces auteurs, la proportion des défaillances atteindrait 1 sur 5. De plus, à la suite de ces intradermo-malléinations, apparaîtrait fréquemment, quelques jours plus tard, une évolution de morve aiguë.

Escofflé et Bailly (3) ont fait les mêmes constatations que les auteurs précédents; pour eux, le taux des défaillances de la malléine au quart atteindrait 1 sur 10 chez le mulet.

C. Giese (4), passant en revue les moyens de diagnostic de la morve, préfère, pour l'âne et le mulet, les épreuves sérologiques, en particulier l'agglutination et la congglutination, à la réaction à la malléine.

Ghinea (5), par contre, n'a enregistré que des succès chez les muets morveux, en utilisant, pour l'intradermo-malléination, 0 c. c. 25 d'une malléine au quart, dans la production de laquelle entrent des bacilles isolés de muets morveux. La

(1) *The Veterinary Record*, 9 octobre 1915, p. 161.

(2) *Revue générale de médecine vétérinaire*, 15 février 1919, p. 65.

(3) Observation inédite.

(4) *Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamt*, 52, n° 3, 1920, p. 468-500.

(5) *Archiva veterinaria*, 1921, p. 98.

réaction se produit de la seizième à la vingtième heure.

Il résulte donc de ces travaux que, dans certains cas, chez le mulet, la malléine donne des résultats peu nets ou même négatifs.

Nous n'avons pas trouvé de travaux spéciaux se rapportant à la recherche des anticorps, chez le mulet, par l'épreuve de la déviation du complément, et indiquant si l'injection de malléine provoque chez cet animal, ainsi que nous l'avons constaté chez le cheval (1), la formation d'anticorps fixant l'alexine au même titre que la sensibilisatrice morveuse.

Nous nous sommes efforcés, dans ce présent travail, d'élucider ces différents points, en suivant un protocole comparable à celui des expériences faites sur le cheval.

Nous avons donc recherché :

1° Si, chez le mulet, l'injection de malléine provoque la formation d'anticorps;

2° Dans quelles limites de temps, après la malléination, la réaction de fixation du complément doit être faite pour que ces résultats soient considérés comme exacts.

TECHNIQUE. — La technique que nous avons suivie a été celle décrite en détail dans notre précédent mémoire. Conformément à ce qu'a signalé Buxton, le sérum à examiner a toujours été chauffé à 60-61°, pour faire disparaître les substances anticomplémentaires fréquentes dans les sérums animaux, et particulièrement abondantes dans le sérum de mulet (2). Nous avons utilisé comme antigène une émulsion microbienne préparée de la façon suivante : à 20 cent. cubes d'eau physiologique à 9 p. 1.000, on ajoute 4 centigrammes de corps microbiens tués, provenant de cultures ayant servi à la fabrication de la malléine; cette émulsion est ensuite portée une à deux minutes à l'ébullition.

Nous avons suivi comme technique celle de Calmette et Massol (3), c'est-à-dire que nous avons employé une dose con-

(1) Ces *Annales*, décembre 1921, p. 879.

(2) The temperature required for the inactivation of mule blood for the complement fixation test for glanders. *Veterinary Journal*, juillet 1917.

(3) *Comptes rendus de la Soc. de Biol.*, 6 janvier 1922, p. 15; *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1916, p. 33, 63, 97.

stante d'antigène et de sérum, et des doses variables d'alexine. Nous avons aussi adopté la méthode de ces auteurs pour la numération des anticorps. Si un volume V du sérum étudié, dévie N doses minima de complément, le rapport $\frac{N}{V}$ représente le nombre de doses minima que peut dévier 1 cent. cube de sérum. L'unité d'anticorps correspond à la quantité de sensibilisatrice capable de dévier une dose d'alexine.

EXPÉRIENCES. — Nous avons expérimenté sur 9 mulets n'ayant pas reçu d'injection de malléine depuis six mois. Une prise de sang préalable montra que le sérum de ces animaux ne possédait pas de sensibilisatrice fixant l'alexine en présence d'antigène morveux.

Nous avons utilisé uniquement la malléine de l'Institut Pasteur.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE.

Apparition et disparition des anticorps.

Dans cette expérience, nous avons déterminé si l'injection de malléine donne lieu à la formation d'anticorps spécifiques. Six mulets reçurent par intradermo-malléination à la paupière 0 c.c. 1 de malléine au quart; trois autres reçurent une malléination sous-cutanée de 2 c.c. 5 de malléine au 1/10^e.

Les tableaux suivants donnent les résultats de la recherche des anticorps, pratiquée dès le lendemain de la malléination, et ensuite, régulièrement tous les deux jours :

A. Six mulets reçoivent 0 c.c. 1 de malléine au quart.

MATRICULE	TEMPS d'apparition des anticorps en jours	TAUX MAXIMUM DES ANTICORPS		TEMPS de disparition des anticorps en jours
		Taux en unités	Temps nécessaire pour ce maximum en jours	
743	6	150	9	37
728	6	450	9	67
738	5	50	9	30
735	6	400	9	60
725	6	200	9	60
739	6	250	9	60

B. Trois mulets reçoivent 2 c.c. 5 de malléine au 1/10^e.

MATRICULE	TEMPS d'apparition des anticorps en jours	TAUX MAXIMUM DES ANTICORPS		TEMPS de disparition des anticorps en jours
		Taux en unités	Temps nécessaire pour ce maximum en jours	
1255	7	50	14	65
1279	7	400	14	87
1252	7	450	14	59

De cette première expérience, on peut conclure que tous les mulets, après une intradermo-malléination ou une malléination sous-cutanée, présentent une sensibilisatrice, dans leur sérum. Celle-ci apparaît, dans le cas de l'intradermo-malléination, cinq ou six jours après l'injection de malléine, et disparaît du trente-septième au soixante-septième jour après l'injection.

Avec 2 c. c. 5 de malléine au 1/10^e, les anticorps apparaissent sept jours et disparaissent du soixante-cinquième au quatre-vingt-septième jour après la malléination.

Le taux le plus élevé des anticorps a varié de 50 à 450 unités, au neuvième jour, pour l'intradermo ; et au quatorzième pour la malléination sous-cutanée.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE.

Influence des malléinations successives.

Cette expérience, tout en servant de contrôle à la première, a eu pour but de voir si la succession des injections de malléine agissait sur le taux et sur la rapidité de formation des anticorps.

A. Dès la disparition des anticorps (voir première expérience, A) trois mulets reçoivent une deuxième intradermo-malléination, suivie d'une troisième et d'une quatrième, pratiquées immédiatement après la mise en évidence du taux le plus élevé d'anticorps, consécutifs à chaque intradermo.

MATRICULE	TEMPS d'apparition des anticorps après la deuxième intradermo	TAUX LE PLUS ELEVÉ DES ANTICORPS au cours des intradermo successives						TEMPS de disparition des anticorps après la quatrième intradermo- malléination
		Taux en unités			Temps nécessaire à obtenir ce taux en jours			
		en jours	deuxième	troisième	quatrième	deuxième	troisième	
743	3	250	500	500	7	7	5	59
738	3	200	500	500	7	5	5	37
735	3	500	1.500	1.500	7	5	5	59

B. Les mêmes mulets, sitôt la disparition des anticorps dus à la quatrième intradermo-malléination, reçoivent une injection sous-cutanée de 2 c. c. 5 de malléine, puis une deuxième, et dans un cas, une troisième malléination, la deuxième et la troisième étant faites sitôt que le taux des anticorps a atteint son maximum.

MATRICULE	NOMBRE de malléinations	TEMPS d'apparition des anticorps après la première malléination en jours	TAUX LE PLUS ÉLEVÉ D'ANTICORPS						TEMPS de disparition des anticorps après la dernière malléination en jours
			Taux en unités			Temps nécessaire à l'apparition du maximum en jours			
			première	deuxième	troisième	première	deuxième	troisième	
743	2	4	500	500	»	10	12	»	71
738	3	8	230	500	700	14	10	15	57
735	2	4	1.500	1.500	»	10	12	»	113

C. Trois mulets reçoivent, après la disparition des anticorps dus à une première intradermo-malléination, 2 c. c. 5, de malléine au 1/10^e, en injection sous-cutanée.

MATRICULE	TEMPS d'apparition des anticorps en jours	TAUX LE PLUS ÉLEVÉ D'ANTICORPS		TEMPS de disparition des anticorps en jours
		Taux en unités	Temps nécessaire en jours.	
728	3	1.000	6	72
725	3	1.000	6	72
739	5	250	6	46

D. Les mêmes mulets reçoivent, dès la disparition des anticorps dus à la malléination sous-cutanée, une deuxième injection de 2 c. c. de malléine au 1/10^e sous la peau.

MATRICULE	TEMPS d'apparition des anticorps en jours	TAUX LE PLUS ÉLEVÉ D'ANTICORPS		TEMPS de disparition des anticorps en jours
		Taux en unités	Temps nécessaire en jours	
728	4	1.500	7	84
725	4	1.200	7	84
739	4	250	7	56

La conclusion à tirer de cette deuxième expérience est que :

1° Les anticorps apparaissent plus rapidement après une deuxième intradermo-malléination ou une deuxième malléination sous-cutanée ; 2° La succession des injections de malléine au quart augmente considérablement le taux des anticorps qui peut atteindre 1.500 unités ; mais elle ne prolonge pas sensiblement leur persistance dans l'organisme ; 3° La succession

des injections sous-cutanées de 2 c. c. 5 de malléine au 1/10° augmente le taux des anticorps dans la même proportion que la malléine au quart (1.500 unités); mais prolonge beaucoup leur temps de disparition qui peut atteindre cent treize jours.

*
* *

Si nous comparons les résultats de ce travail avec ceux que nous avons obtenus chez le cheval, nous enregistrons les différences suivantes :

	CHEVAL	MULET
1° Injection intradermique de 0 c. c. 4 de malléine au quart.	Apparition d'anticorps dans 40 p. 100 des cas.	Apparition d'anticorps dans 100 p. 100 des cas.
2° Une première injection sous-cutanée de 2 c. c. 5 de malléine au 1/10° fait apparaître des anticorps.	Dans 80 p. 100 des cas.	Dans 100 p. 100 des cas.
3° Après une ou plusieurs injections de malléine au quart ou au 1/10°:	Taux des anticorps peu élevé, 25 unités en moyenne, exceptionnellement 80.	Taux considérable même après la première malléination (450); peut atteindre 1.500 après plusieurs malléinations.
4° Après une malléination intradermo ou sous cutanée.	Apparition des anticorps du quatrième au huitième jour; disparition après le quarante-cinquième jour.	Apparition après une intradermo, du cinquième au sixième jour; disparition du trente-septième au soixante-septième jour. Apparition après une sous-cutanée, au septième jour; disparition du soixante-cinquième au quatre-vingt-septième jour.
5° Après deux ou plusieurs malléinations.	Apparition des anticorps du quatrième au huitième jour; disparition au quarante-cinquième jour.	Apparition des anticorps du troisième au quatrième jour; disparition au cent treizième jour.

CONCLUSIONS.

I. Une injection intradermique de 0 c. c. 1 de malléine au 1/4, ou de 2 c. c. 5 de malléine au 1/10^e, fait apparaître, dans tous les cas, chez le mulot, une sensibilisatrice spécifique.

II. Cette sensibilisatrice apparaît du cinquième au septième jour après une première injection de malléine. Après plusieurs malléinations, elle peut être décelée du troisième au quatrième jour.

III. Les anticorps formés dans l'organisme atteignent toujours un taux très élevé (400 à 1.500 unités).

IV. Le temps nécessaire pour que ces anticorps disparaissent est variable; il oscille de trente-sept à cent treize jours.

La conclusion pratique à tirer de ce travail est la suivante : si l'on veut associer la déviation du complément à la malléine, dans le diagnostic de la morve, chez le mulot, il faut prendre le sang avant malléination ou bien, avant le cinquième jour s'il s'agit d'une première malléination, ou avant le troisième si le mulot a déjà reçu une ou plusieurs injections de malléine. Il faudra attendre ensuite au moins cent treize jours après la malléination, pour pouvoir prendre utilement du sérum.

*(Institut Pasteur et Laboratoire militaire
de recherches vétérinaires.)*

DE LA STÉRILISATION DES LIQUIDES EN CIRCULATION CONTINUE, SOUS COUCHE MINCE

ÉVOLUTION DE LA MÉTHODE ET TRANSFORMATION SUCCESSIVE DES APPAREILS

par HENRI STASSANO.

J'abordai en 1911 (1) le problème de la stérilisation des liquides, en circulation continue sous couche mince, en me servant comme agent stérilisateur de l'action abiotique des rayons ultra-violetes.

Je faisais circuler le liquide, dans l'espèce, une émulsion de bacilles typhiques ou paratyphiques, par aspiration ou par pression, sous la lampe à mercure, entre une lame rectangulaire de quartz et une surface métallique, de même forme et dimensions et, comme la première, parfaitement plane. Un cadre en papier, très mince, appliqué sur les bords de la plaque métallique déterminait entre elles l'écartement et servait à la fois de joint. A l'intérieur de son périmètre, il formait, avec les deux surfaces qu'il séparait, une véritable cuve, maintenue étanche par la pression extérieure des boulons échelonnés à la périphérie, à l'endroit du cadre. La circulation du liquide y était assurée par de petits trous percés aux deux extrémités des petits côtés de la surface métallique, sur une ligne droite, perpendiculaire au grand axe, en dedans et au ras même du cadre. Chacune des deux rangées de trous communiquait avec un caniveau creusé au-dessous et en rapport respectivement avec l'arrivée et la sortie du liquide.

Tant qu'il s'agissait d'émulsions microbiennes bien homogènes, pas trop chargées, les résultats étaient parfaits. Les microbes étaient tués tous presque instantanément, sans être sensiblement modifiés. Ils s'agglutinaient sensiblement au même taux que les germes vivants. Mais la stérilisation com-

(1) C. R. de l'Académie des Sciences, 6 mars 1911.

plète n'était plus obtenue que très difficilement et en ralentissant outre mesure l'écoulement, lorsqu'on opérait sur des liquides naturellement opaques ou sur des émulsions microbiennes pas assez homogènes, ou dont le titre dépassait un milliard par centimètre cube.

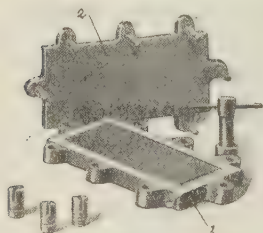


FIG. 1 et 2.

Je fus amené ainsi à renoncer aux rayons ultra-violet et à utiliser à leur place les rayons calorifiques, autrement plus pénétrants et faciles à obtenir et à employer. J'eus seulement à substituer (fig. 1 et 2) à la lampe de quartz une pièce en bronze nickelé, identique

à la plaque sur laquelle la première était posée dans le dispositif que je viens de décrire.

Pour découper le cadre en papier servant à la fois de joint et de périmètre latéral de la cuve constituée par les deux surfaces métalliques ci-dessus (fig. 1 et 2), je me servais de la flamme. Le canif déchire le papier de soi-même très mince. Pour ce faire, les feuilles de ce papier, papier japon, sont placées bien



FIG. 3 et 4.

étendues entre deux cadres métalliques identiques (fig. 3 et 4) au cadre à découper. Les deux cadres sont appliqués exactement l'un contre l'autre et les feuilles de papier y sont assujetties, comme dans un métier, à l'aide de 4 pinces élastiques en acier. On passe le tout sur la flamme d'un brûleur. Le papier s'enflamme immédiatement et brûle complètement, sauf dans la partie pro-

tégée entre les deux cadres. On écarte alors ces derniers délicatement et l'on en retire les cadres en papier nettement découpés.

A l'aide de cet appareil, préalablement stérilisé, pour l'emploi qu'on doit en faire, dans un autoclave se transformant ensuite en un bain-marie, à température constante, mais réglable à volonté, je réussis à déterminer avec plus de précision qu'il

n'avait été fait jusque-là, les limites de résistance à la chaleur de différentes espèces de microbes. Je parvins notamment à établir que les éléments sphériques ou arthrospores de Hueppe sont effectivement plus résistants que les formes en virgule du vibrion du choléra, ainsi que Hueppe et d'autres auteurs l'avaient prétendu sans pouvoir le démontrer d'une façon certaine (1). Récemment, M. Sanarelli (2) s'est rapproché davantage de cette même démonstration, quoique par un procédé également biologique.

D'autre part, la grande régularité avec laquelle je pouvais soumettre dans cet appareil, en circulation continue, à l'action de la chaleur, les émulsions microbiennes, me permit d'obtenir rapidement d'importants volumes de ces émulsions dans lesquels les microbes avaient été tués tous indistinctement dans les mêmes conditions limites de température et de temps.

Au contraire, le procédé usuel de stérilisation en vase clos, au bain-marie, même avec agitation mécanique, dont on se sert particulièrement dans la fabrication des vaccins microbiens chauffés, se comporte bien défectueusement à cet égard. On trouve, en effet, dans les bouillies de microbes traitées de la sorte, à côté de la très grande majorité des microbes atteints dès les premières dix ou quinze minutes de chauffage, une petite fraction de ces mêmes microbes qui échappe encore pendant une heure ou deux à l'action meurtrière de la chaleur. Aussi, à la fin de l'opération, les premiers sont complètement coagulés, archicuits. L'affaiblissement d'agglutinabilité très marqué que ces bouillies microbiennes stérilisées en ampoules scellées accusent à l'égard des sérums spécifiques le prouve surabondamment.

Les agglutinines, par contre, des microbes également stérilisés par la chaleur, mais en circulation continue sous couche mince, se montrent aussi bien conservés; sinon mieux, que les agglutinines des microbes soumis dans des conditions semblables à l'action abiotique des rayons ultra-violets.

Ces résultats si encourageants me permirent de construire un deuxième appareil plus grand, de 27×17 centimètres, et à

(1) *C. R. de l'Académie des Sciences*, 21 juin 1915.

(2) *Ces Annales*, 37, 1923, p. 373.

3 plaques assemblées l'une sur l'autre (fig. 5 et 6). En interposant entre elles deux cadres en papier japon, pareil à celui du premier appareil, on monte, avec le même serrage et une seule plaque en plus, deux cuves à la place d'une seule.

Au début, je fis fonctionner cet appareil de façon que ses deux cuves recevaient et évacuaient en même temps le liquide. Celui-ci pénétrait par le caniveau creusé à l'une des extrémités de la plaque moyenne, passait ensuite simultanément d'un côté et de l'autre par deux rangées de trous bilatérales dans les

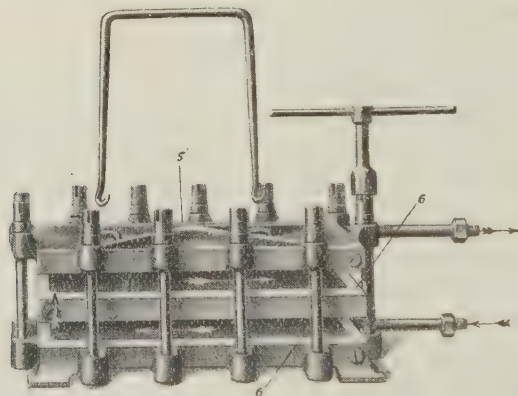


FIG. 5 et 6.

deux cuves qu'il traversait d'un bout à l'autre, sur toute la surface, et finissait par se déverser des deux côtés à la fois, dans le caniveau homologue, creusé à l'extrémité opposée de la même plaque moyenne et communiquant avec l'extérieur.

J'ai dit que le liquide traverse régulièrement ces minces mais très larges cuves rectangulaires. J'ai pu m'en assurer d'abord par l'observation directe, dans le premier appareil à lame transparente de quartz. Le liquide avançait régulièrement, en suivant une ligne parallèle à la rangée de trous d'où il jaillissait, pour atteindre la rangée opposée de sortie. Ensuite, dans les appareils entièrement métalliques, en écartant les plaques constituant les parois de ces cuves après le passage d'un liquide coloré : sur toute leur surface, on retrouvait la couleur très homogènement répandue.

Plus tard, je fis passer le liquide successivement, tel que les

flèches l'indiquent dans la figure 5, d'une cuve à l'autre. J'avais remarqué que la traversée utile, en couche mince de 25 centimètres, à la température limite et avec la vitesse de 1 à 2 mètres par seconde, n'était pas suffisante pour atteindre tous les microbes d'une émulsion qui en renfermait plusieurs milliards par centimètre cube.

Avec ce deuxième appareil, j'ai opéré sur des volumes plus importants de liquides et avec les liquides les plus variés. En comparant les résultats que j'ai obtenus par ce procédé de la circulation continue en couche mince, avec les résultats courants donnés par la stérilisation en vase clos, j'ai été amené à conclure que « la durée du chauffage est le facteur principal des altérations provoquées par la chaleur dans les êtres vivants et leur milieu organique de nature albuminoïde. Au contraire, le degré de la température, dans certaines limites bien entendu, n'y joue qu'un rôle secondaire » (1).

En voici quelques exemples des plus caractéristiques :

I. Une émulsion d'albumine d'œuf à 1 p. 100 dans de la solution physiologique, chauffée au bain-marie à 58° dans une boule de verre scellée à la lampe, sous le volume de 300 cent. cubes, devient opalescente au bout de une heure. Cette émulsion garde, par contre, toute sa limpidité lorsqu'elle est portée pendant une fraction de seconde à 75°.

II. Une dilution de fibrinogène (plasma salé de sang de cheval, étendu de 49 volumes d'eau à 5 p. 100 de NaCl) précipite en moins de quinze minutes de séjour au bain-marie à 56° : le fibrinogène, au contraire, garde sa parfaite stabilité lorsqu'il est porté un instant à la température relativement élevée de 70°.

III. Un litre de toxine tétanique, chauffée au bain-marie à 55° pendant une heure, perd tout son pouvoir, même vis-à-vis des animaux les plus sensibles, le cheval et la souris. Cette même toxine passant dans mon appareil chauffé, 80°, où elle atteint momentanément 68°, gardé encore une partie de son activité. Une souris à qui on injecte 0 c. 5 d'une toxine qui tue la souris témoin au 1/5.000 ne meurt pas, mais reste fortement paralysée pendant plus de trois semaines.

Chauffée seulement à 56°5 et à 60°5 par ce même procédé, la toxine tétanique qui tue une souris témoin au 1/3.000 de centimètre cube en deux jours n'accuse pas d'affaiblissement aux différentes dilutions de 1/1.000 à 1/7.000.

IV. Du sérum antitétanique de cheval, chauffé en couche mince à 67° pendant une fraction de seconde, se comporte absolument comme un échantillon non chauffé du même sérum. Chauffé au bain-marie à une température plus basse, 56° mais pendant une heure quinze minutes, ce même sérum manifeste un léger affaiblissement.

(1) C. R. de l'Académie des Sciences, 2 juillet 1917.

V. Du lait de vache, stérilisé à 126° - 128° par ce procédé, n'accuse ni la couleur, ni le goût de cuit bien caractéristiques du lait stérilisé en bouteille à l'autoclave à la température inférieure de 115° . Et ce qui est encore plus démonstratif pour la thèse que je soutiens, c'est que ce lait stérilisé en couche mince, même s'il est porté à une température plus haute, à 133° , se montre beaucoup moins touché par le chauffage vis-à-vis de la présure, que du lait simplement porté à l'ébullition pendant quelques minutes.

En effet, ce lait dont la blancheur ni le goût naturel ne trahissent nullement la forte épreuve qu'il a supportée, caille par addition de lab-ferment presque aussi vite que du lait frais et forme un coagulum épais qui laisse exsuder à peine un sérum parfaitement transparent, comme du lait frais. Le même lait, chauffé quinze minutes au bain-marie à 100° , présente des coagulums plus tardifs, beaucoup moins compacts, accusant des stries à l'intérieur des précipités; les sérums qu'ils exsudent abondamment sont verdâtres. Quant au lait stérilisé à l'autoclave, on sait qu'il ne coagule plus par addition de présure.

VI. Le principe, qui découle si nettement et avec autant de constance de tous les nombreux et variés essais que j'ai faits du chauffage en couche mince, trouve une nouvelle confirmation dans le fait suivant :

Le lait chauffé à 75° au bain-marie pendant cinq minutes, c'est-à-dire avant même que toute sa masse ait pris cette température, ne donne plus les réactions des diastases oxydantes et réductrices. Du même lait chauffé dans mon appareil, même à la température de 80° , réagit encore très nettement aux réactifs employés pour mettre en évidence ces enzymes. Seul un léger affaiblissement se manifeste à l'égard de la peroxydase.

Ce dernier appareil, grâce à l'écartement minime de $1/100$ de millimètre, entre les surfaces chauffantes, et à l'extension considérable de ses cuves, se comporte comme un grand et très précis viscosimètre, en ce sens que le débit des liquides qui le traversent, varie régulièrement selon leur degré différent de viscosité ou selon qu'ils y accomplissent une traversée simple ou double, la pression étant la même.

Cependant, par son mode particulier de fonctionnement, à des températures différentes supérieures à celle du laboratoire, il fournit des données non moins précises d'un autre ordre, sous la dépendance néanmoins de la viscosité, de l'adhésion capillaire et de la tension superficielle (1).

Si on y fait passer une émulsion microbienne légère, sous la pression constante de 1 kilogramme d'azote, on note que la température prise par l'émulsion, dans la traversée simple ou double de l'appareil, est quelque peu inférieure à celle du bain-marie où il est immergé. Au fur et à mesure que l'épais-

(1) *C. R. de l'Académie des Sciences*, 5 novembre 1923.

ECARTS ENTRE LA TEMPÉRATURE DU BAIN-MARIE ET LA TEMPÉRATURE DE L'ÉMULSION (PARATYPHIQUE B) APRÈS LA TRAVERSÉE SIMPLE OU DOUBLE DE L'APPAREIL.

Traversée simple, parcours : 25 centimètres.

*Teneur de l'émulsion en microbes : 3 milliards et demi par centimètre cube ;
débit : 20 litres à l'heure.*

TEMPÉRATURE EN DEGRÉS		RÉSULTAT BACTÉRIOLOGIQUE	
Bain-marie	Emulsion à la sortie	Ensemencement en bouillon	Ensemencement en boîtes de Petri.
75	73	0	0
73	72	0	0
71,5	70	0	0
69,5	68,5	+	0
67	65	+	0
65	63	+	3 col.
62	61	+	101
60	59	+	629

*Teneur de l'émulsion en microbes : 25 milliards par centimètre cube ;
débit : 13 à 14 litres à l'heure.*

TEMPÉRATURE EN DEGRÉS		RÉSULTAT BACTÉRIOLOGIQUE
Bain-marie	Emulsion à la sortie	Ensemencement en bouillon
78	73,5	0
77	73,2	0
75,5	72	0
74,5	71	0
74	69	+
72,5	68	+
70,5	66,5	+
69,5	65,5	+

Traversée double, parcours : 50 centimètres.

*Teneur de l'émulsion en microbes : 28 milliards par centimètre cube ;
débit : 6 lit. 20 à l'heure.*

TEMPÉRATURE EN DEGRÉS		RÉSULTAT BACTÉRIOLOGIQUE	
Bain-marie	Emulsion à la sortie	Ensemencement en bouillon	Ensemencement en boîtes de Petri
77	64	0	0
74	63,2	0	0
73	63	0	0
71	62	0	0
69	59,5	+	55.000 col.
68	58	+	120.000 col.

seur de l'émulsion, c'est-à-dire sa teneur en microbes par centimètre cube, augmente, la valeur de cet écart croît parallèlement, ainsi que le montre nettement le tableau précédent. J'y ai consigné les résultats de trois différentes séries d'observations recueillies en 1917-1918 avec la collaboration de M. Lemaire, de l'Institut Pasteur d'Alger et chef du Laboratoire d'Hygiène de la même ville.

Il appert nettement de la comparaison des chiffres mis en regard dans les trois colonnes de ce tableau que, dans les limites des expériences, plus une émulsion met de temps à traverser l'appareil, soit qu'elle renferme un plus grand nombre de microbes, soit qu'elle ait à y parcourir un trajet double, moins elle se chauffe. Le contraire devrait se produire.

La chaleur spécifique de l'albumine étant à peu près celle de l'eau, ce fait, en apparence paradoxal, ne peut tenir sûrement à ce que les microbes retiendraient, dans ces 2 cas, une plus forte proportion de chaleur aux dépens du liquide dans lequel ils baignent.

La seule explication vraisemblable, en tous points conforme aux lois de la physique, est, je crois, que les microbes fortement attirés par l'adhésion capillaire exercée sur eux par les parois métalliques entre lesquelles ils circulent en traversant l'appareil, se rapprochent de plus en plus de celles-ci en gagnant la sortie. Il doit en résulter une sorte de calfeutrage mouvant des plaques chauffantes, gênant nécessairement le libre jeu des courants de convection de la chaleur qui s'en dégagent. Dans ces circonstances, les microbes sont atteints plus directement par la température de stérilisation, alors que le liquide environnant en ressent moins les effets.

Telle doit être, d'ailleurs, ce me semble, l'explication des résultats si favorables auxquels je suis parvenu grâce à ce système de stérilisation, notamment avec un liquide organique tel que le lait, si difficile à conserver à cause de la très grande résistance de quelques-unes des espèces microbiennes qui le souillent habituellement et à cause de son extrême fragilité au chauffage. On y réussit en le traitant par la chaleur en couche mince pendant un laps de temps minime, et on lui conserve ainsi son goût délicat, sa couleur naturelle et, sans modifications appréciables, sa composition chimique et sa valeur alimentaire.

*
* *

D'un côté, la difficulté d'ordre technique d'obtenir des surfaces planes à la raboteuse, et des surfaces planes qui ne se déforment pas par le chauffage, particulièrement au delà de 100°, et de l'autre, la recherche d'un brassage plus intense et répété du liquide au cours du traitement, me portèrent à transformer l'appareil à trois plaques planes en un appareil composé également de trois plaques qui, au lieu d'être planes et

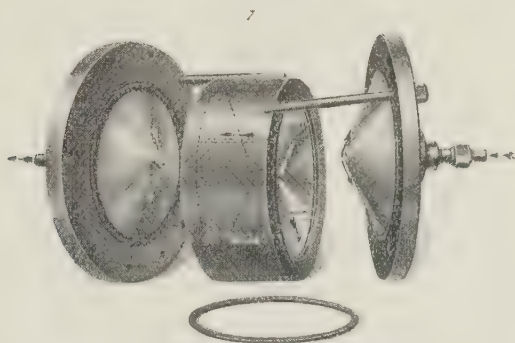


FIG. 7.

de s'empiler l'une sur l'autre, sont coniques et s'emboîtent exactement l'une dans l'autre.

Ce nouvel appareil, représenté en relief (fig. 7) et en section (fig. 7 *bis* et 7 *ter*), comprend une pièce centrale cylindrique circulaire 1 et à base plane 1^a et 1^b, dans chacune desquelles est creusé un cône circulaire 2^a et 3^a à sommet émoussé. Ces deux cônes en creux sont opposés par leur sommet.

A la base de chaque surface conique est pratiquée une rigole 4, à section circulaire et quatre canaux 5, qui traversent le bloc central et font communiquer entre elles les deux rigoles en anneau.

Dessus et dessous ce bloc central sont appliquées respectivement les plaques circulaires 6 et 7 qui sont identiques dans l'ensemble. Elles présentent chacune, d'une part, un cône central en saillie, s'adaptant au bloc central et, d'autre part,

un saillant cylindrique circulaire 6 et 7 du côté opposé et sur le même axe.

Les trois pièces étant emboîtées l'une dans l'autre, on les maintient serrées l'une contre l'autre, à l'aide d'une couronne de boulons passés dans les trous pratiqués à cet effet sur la périphérie des plaques circulaires 6 et 7.

Il apparaît dès lors évident qu'en interposant entre les

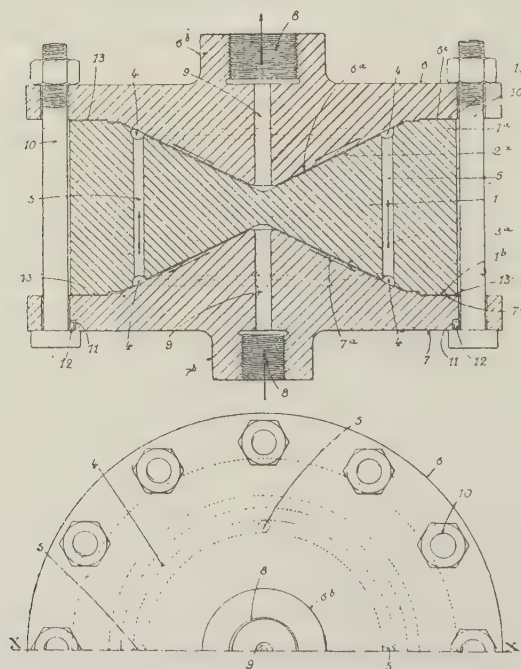


FIG. 7 bis et 7 ter.

faces 1^a 6^o et 1^b, 7^c, des pièces 1, 6 et 7 des disques d'épaisseur uniforme, en papier, par exemple, comme dans les appareils précédents, les surfaces coniques de ces trois pièces s'emboîtant pour former un cylindre circulaire complet, les surfaces coniques en creux 6^a et 7^a se trouveront écartées des surfaces en creux 2^a et 3^a du bloc central 1, d'une distance uniforme et proportionnelle à l'épaisseur des disques interposés, tout comme dans le système à plaques planes où les cadres en

papier déterminent la hauteur des cuves qu'ils contribuent à former et en assurent à la fois l'étanchéité.

Si alors, les trois plaques coniques ci-dessus étant emboîtées l'une dans l'autre et étant retenues fortement l'une contre l'autre par le serrage circulaire à boulons portant directement dans la verticale des disques, on fait pénétrer, sous pression, un liquide par l'une des deux ouvertures, par exemple, par le trou cylindrique 8 de la pièce 6, ce liquide se répandra en couche mince, dans l'espace formé entre les deux premiers cônes 2^a et 6^a, jusqu'à la base en anneau de ces mêmes cônes et par la rigole adjacente 4 de la surface conique 2^a limitée entièrement par le disque 13 formant garniture, atteindra, passant par les quatre canaux 5 qui les relie, l'autre rigole 4 de la surface conique 3^a, également limitée par le joint circulaire 13 correspondant. Le liquide remontera de là, de nouveau en nappe mince, dans l'espace qui sépare les deux surfaces coniques 3^a et 4^a et finira par aboutir au trou central 8 de sortie de la pièce 7.

Dans la figure 7 représentant cet appareil en relief, avec les trois pièces éloignées l'une de l'autre pour en montrer les détails intérieurs, on peut suivre aisément, par les flèches qui y sont apposées, ce chemin du liquide. A deux reprises, il s'y répand en nappe sous couche mince, se terminant ou prenant origine, sous cette forme, d'une rigole circulaire pour se recollecter ensuite en masse.

Le double but, à savoir : le traitement par la chaleur du liquide en circulation continue sous couche mince et le brassage complet du liquide pendant le traitement est, de la sorte, réalisé dans cet appareil à trois plaques coniques. Il suffit de l'immerger dans un bain-marie à température constante réglable, ou dans une atmosphère de vapeur sous pression, pour les températures supérieures à 100°.

*
* *

Cependant, malgré ces réels avantages, je ne tardai pas à m'apercevoir que la difficulté d'entretenir la température de stérilisation pendant l'écoulement persistant du liquide, déjà rencontrée dans les appareils à plaques planes, s'accusait

davantage encore avec l'appareil à plaques coniques. Cette difficulté était de nature à en limiter l'emploi aux opérations de courte durée, les essais de laboratoire, la préparation des auto-vaccins. La plus forte épaisseur des plaques en était naturellement la cause, y rendant bien plus difficiles les échanges de températures, malgré la bonne conductibilité du métal employé, le bronze.

Je cherchai à remédier à ce défaut, d'abord en tiédissant le liquide avant son introduction dans le stérilisateur et en faisant fonctionner, d'autre part, celui-ci dans une masse considérable d'eau entretenue énergiquement à la température utile. Pour les températures supérieures à 100°, ce volant d'eau était sous pression de vapeur. J'avais déjà recouru à ce double expédient pour assurer, pendant quelque temps au moins, la marche régulière de la stérilisation dans les appareils à plaques planes. Pour y faciliter l'entretien du chauffage de la plaque moyenne, j'avais même doté latéralement celle-ci, dans le dernier modèle que j'ai construit, d'ailettes de radiateurs.

J'ai recouru, dans la suite, à l'électricité comme source de chaleur. Une forte résistance électrique était enroulée autour du bloc cylindrique des trois plaques.

Les résultats furent meilleurs, particulièrement avec ce dernier mode de chauffage, sous la dépendance d'un régulateur approprié. Mais même une opération d'une importance moyenne, en durée et volume de liquide traité, exigeait une forte dépense d'énergie électrique.

Devant cette nouvelle difficulté, je me rappelai le rôle singulier des plaques chauffantes, consistant, ainsi que je l'ai expliqué plus haut, à agir d'une façon élective sur les microbes en suspension dans un liquide venu à leur contact et je cherchai à en tirer parti dans mes appareils de stérilisation, où je n'avais pu réussir à entretenir jusqu'alors, d'une façon continue, la température convenable.

Seulement, la connaissance de ce mode si particulier d'action d'une surface métallique à un certain degré de température pouvait me permettre, à moi qui m'étais auparavant tant appliqué à réaliser la couche la plus mince dans le traitement des liquides par la chaleur, de me libérer quelque peu de ce souci, élevé en principe. Il n'en est pas moins vrai que dans la

nouvelle voie que m'ouvrait cette constatation, je ne cessais de poursuivre le même but : chercher à atteindre directement les microbes. Le principe directeur ne variait donc pas substantiellement et on le retrouve, en effet, tel que dans le type de mes derniers appareils, en apparence assez différents des premiers, auxquels j'ai fini par aboutir.

Au lieu de continuer à faire passer le liquide sous une couche mince, de la valeur de quelques centièmes de millimètre au plus, qui ne peut être obtenue régulière que par le rapprochement d'épaisses masses métalliques, dressées en surfaces planes ou coniques, forcément impropres aux échanges rapides de températures, j'osai enfin augmenter la distance entre les surfaces chauffantes. Cela me permettait de réduire d'emblée, dans des proportions considérables, ajouterai-je inattendues, leur épaisseur.

Certes, j'affaiblissais ainsi beaucoup ce rôle particulier de la surface chauffante d'attirer les microbes qui s'en approchent, basé sur l'adhésion capillaire, nécessairement diminuée dans les nouveaux dispositifs que j'allais construire, à veine liquide 50 à 100 fois plus épaisse. Mais, en y donnant parallèlement un développement beaucoup plus grand au trajet du liquide, je pouvais espérer de compenser une telle diminution : rattraper plus loin les microbes échappés dans les premiers tronçons du stérilisateur à l'action meurtrière de la chaleur. En d'autres termes, je diminuais, d'une part, par unité de surface, l'efficacité destructive pour les microbes de la plaque chauffante, et j'accroissais, de l'autre, dans une plus forte proportion, son rayon d'action.

De plus, dans le système d'appareil à plaques épaisses, il était impossible de donner un grand développement au trajet du liquide. Dans le modèle le plus grand que j'ai construit, mesurant 38×17 centimètres, la double traversée du liquide, le long de ses deux cuves parallèles, ne dépasse pas 72 centimètres.

Pour réaliser ce nouveau dispositif, je choisis tout simplement un tube en laiton très long, de fort diamètre, mais à parois très minces, régulièrement aplaties d'un même côté, en forme de ruban, de 20 millimètres de largeur. Ces tubes aplatissés constituaient une cavité uniforme, de section rectangulaire,

d'un peu moins de 1 millimètre. Pour en faciliter l'emploi, je le pliai en spires. Pour traiter d'importants volumes de liquides à la fois, j'embranchai plusieurs de ces serpentina à ruban sur un même tuyau nourrice (fig. 8).

Soit qu'il fonctionnât dans un bain-marie, pour les traitements à basse température, soit dans un manchon à circulation de vapeur, pour les traitements à haute température, il était toujours très facile d'en maintenir les parois à la température voulue et aussi longtemps que l'opération durait : ceci à l'égard des échanges de températures.

A l'égard de la stérilisation elle-même, les résultats n'étaient



FIG. 8.

pas moins satisfaisants, à tel point que je pus réduire de la moitié la longueur du tube aplati dont je m'étais servi au début. Il fallait, bien entendu, limiter dans une certaine mesure la vitesse du liquide qui le traversait.

Ce long serpentina aplati, si facile à monter, présentait cependant le double et irrémédiable défaut que sa surface intérieure ne pouvait être nettoyée à fond et directement comme les surfaces des appareils à plaques et comme l'exigent les opérations auxquelles il aurait dû être destiné. Elle ne se prêtait, non plus au nickelage ou à l'étamage requis pour le traitement des liquides alimentaires, le lait et la bière notamment.

Je puis, néanmoins, pratiquer avec ce dispositif de bien nombreuses et très variées expériences. Aussi, si ce tube aplati ne m'a pas apporté la solution du problème que je poursuivais

depuis déjà plusieurs années, il m'y a conduit quand même, mais par une voie parallèle.

Les deux données expérimentales suivantes, que j'en ai retenues, m'ont été, en effet, un guide précieux et sûr pour rechercher et établir, à la fin, le type actuel de mes appareils de stérilisation des liquides par la chaleur, en circulation continue. Les voici : 1° l'épaisseur de 1/2 millimètre à 1 millimètre d'une paroi métallique, en laiton particulièrement, se prête parfaitement aux échanges rapides, immédiats de températures exigés par la circulation intense d'importantes masses de liquides à maintenir à une température donnée; 2° l'épaisseur de 1/2 millimètre à 7 ou 8 dixièmes de millimètres, pour la couche du liquide qui doit circuler entre des surfaces chauffantes disposées parallèlement, suffit à ce que tous les microbes qu'il véhicule soient atteints par la chaleur au cours de la traversée qu'il accomplit. Il faut pourtant que ce liquide ne soit ni trop chargé en microbes, ni qu'il glisse entre ces surfaces chauffantes, relativement assez distantes l'une de l'autre, à une vitesse trop grande, qui dépasse en moyenne une seconde et demie par mètre linéaire de parcours.

Ayant reconnu ainsi clairement les avantages que des tubes étirés en laiton, à parois lisses et minces, présentent comme surfaces chauffantes dans un appareil de stérilisation, et me trouvant, d'autre part, dans l'impossibilité de les utiliser sous la forme de serpentín à ruban, j'eus l'idée de tourner ce dernier obstacle, de prime abord insurmontable, de la manière suivante, au demeurant la plus simple au monde. Ce sont les solutions les plus simples auxquelles on songe en dernier. Au lieu de déterminer l'espace réduit par lequel j'avais à traiter les liquides, avec un seul tube en laiton, en l'aplatissant, je le formai avec les parois de deux tubes, également en laiton, les logeant l'un dans l'autre.

Je constituai de la sorte aussi aisément un interstice annulaire bien régulier, à parois également minces et propres aux échanges de températures que le creux rectangulaire du tube unique. Cet interstice annulaire présente, en outre, bien d'autres avantages sur le précédent, dont quelques-uns d'importance capitale. Car ce sont eux qui permettent de résoudre la difficulté, insurmontable dans l'autre, du nettoyage et de l'éta-

mage intérieur : 1° la résistance intérieure de l'interstice constitué par l'assemblage de deux tubes, l'un dans l'autre, concentriquement, est considérable : pratiquement, il ne se déforme pas; 2° cet interstice peut être réalisé d'une épaisseur

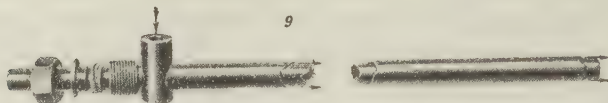


FIG. 9.

sensiblement plus restreinte que dans le tube aplati et avec une plus grande régularité; 3° il se monte et se démonte avec la plus grande facilité, ce qui permet le nettoyage direct des parois aussi parfait que celui des surfaces planes ou coniques des appareils à plaques épaisses; 4° et enfin il permet le nickelage ou l'étamage parfait et renouvelable des parois des tubes qui le constituent.

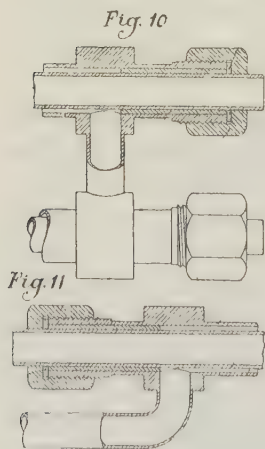


FIG. 10 et 11.

Par de fines nervures soudées sur le tube de moindre calibre (au tour, on en réduit exactement l'épaisseur), et même tout simplement par une garniture en ficelle d'amiante, appliquée aux deux tubes l'un dans l'autre. Cette garniture empêche leurs parois de se toucher et maintient en outre l'étanchéité du long interstice annulaire résultant entre les deux tubes (fig. 9).

Pour préciser, le tube intérieur, selon que l'indiquent les croquis (fig. 10 et 11), est ouvert aux deux bouts, tandis que l'espace annulaire est fermé à chaque extrémité par un manchon emboîté sur le premier. Le tube extérieur est fileté à ses deux extrémités et sur chaque partie filetée se visse un manchon qui emboîte le tube de moindre calibre et qui sert de joint contre les bouts du tube et du manchon.

Une nouvelle difficulté survient ici. La voie en couche étroite,

sinon tout à fait mince que je pouvais réaliser avec pareil assemblage, ne pouvant guère dépasser les 2 mètres. Car il n'est pas possible de faire coulisser l'un dans l'autre des tubes trop longs dont les diamètres se suivent à quelques millimètres près. Or, dans mes essais antérieurs, avec le serpentín à ruban, j'avais constaté qu'il fallait au moins un parcours de deux mètres et demi pour traiter les liquides sous la couche relativement épaisse de 1 millimètre environ. D'ailleurs, même pour le démontage et le remontage des tubes, ainsi que pour leurs organes de chauffage, bain-marie ou manchon de vapeur, il n'était guère pratique de dépasser cette longueur de 2 mètres.

Il me fallut donc, dès le début, joindre l'un à la suite de l'autre deux de ces interstices annulaires formés chacun par l'assemblage concentrique de deux tubes de 2 mètres de longueur. Plus tard, pour certaines opérations à fort rendement, pour la pasteurisation de la bière, par exemple, j'ai été obligé de réunir en série jusqu'à quatre de ces éléments et jusqu'à six ou huit moins longs, pour traiter les émulsions microbiennes. On forme ainsi une sorte de long serpentín métamérique, démontable en chaque élément.

Le liquide, en pénétrant de plein jet et de côté, fig. 9, 10 et 11, par un tuyau relié à une pompe aspirante-foulante, dans l'espace annulaire d'un de ces éléments à tubes concentriques, s'étale en nappe mince et le suit de bout en bout, sous cette forme, jusqu'à ce qu'il se ramasse pour passer de plein jet dans l'extrémité d'un autre long interstice annulaire, identique, constitué par un second élément à tubes concentriques. Là également, le liquide tour à tour s'étale en lame mince et se replie en couche épaisse, à opération finie.

Me voilà ainsi revenu, par la nouvelle voie que le serpentín à ruban m'avait tracée, aux schémas de l'appareil à trois plaques coniques constituant de même un assemblage cylindrique où le liquide, avec la même alternance utile de traitement par la chaleur en couche mince et de brassage intime de la couche au cours du traitement, se répandait, à deux reprises, en nappe circulaire, pour reprendre chaque fois sa forme primitive. Si ce n'est que l'assemblage des tubes concentriques, à minces parois de laiton, apporte avec lui deux immenses avantages : l'épanouissement des surfaces chauffantes et leur réalisation

sous l'espèce la plus propice aux échanges immédiats de températures. Aussi, il convient d'envisager ce dernier type d'appareil à tubes concentriques comme le développement logique et à la fois le perfectionnement, de caractère industriel, du premier.

Les résultats ne pouvaient manquer d'être meilleurs. Mais, comme dans ce mémoire, j'entends me borner à la description analytique des appareils que j'ai imaginés et perfectionnés dès 1911, pour arriver à stériliser les liquides en circulation continue, d'une façon rationnelle et sûre, je m'arrêterai à présent à leurs caractéristiques d'ordre technique.

*
* *

Dans l'appareil à plaques planes n° 2, dont je me suis le plus longtemps servi et avec lequel j'ai établi, pour ainsi dire, la technique de la stérilisation des liquides, par la chaleur, en circulation continue, j'avais deux cuves parallèles avec quatre larges surfaces chauffantes, mesurant chacune, entre le périmètre des cadres respectifs, 25×15 centimètres, soit une surface totale chauffante de 1.500 cent. carrés, avec une capacité minime, 1 cent. $1/2$ seulement, la hauteur des cuves étant à peine de $1/100$ de millimètre.

En y faisant circuler, sous la pression uniforme d'un tube d'azote, de $1/2$ kilogramme à 2 kilogrammes et des débits allant respectivement de 12 à 30 litres par heure, des émulsions microbiennes, b. typhiques ou b. paratyphiques, vibrions du choléra, etc., j'ai pu en obtenir la stérilisation complète en maintenant le bain-marie dans lequel l'appareil était immergé, à 5 ou 6° au-dessus de la température à laquelle les mêmes émulsions sont stérilisées en vase clos, dans des ampoules scellées, plongées également dans un bain-marie, après une ou deux heures de chauffage.

Dans mon appareil, au contraire, ces émulsions n'y restaient, en tout, entre l'entrée et la sortie, qu'une fraction de seconde, de $1/45$ à $1/18$. Et l'action des surfaces chauffantes s'exerçait sur elles d'une façon aussi régulière que rapide, grâce certainement à la distance minime à laquelle l'une s'y trouvait de l'autre, dix hauteurs environ de microbes. Je m'en

suis assuré en faisant baisser la température minima à laquelle l'émulsion sortait stérile de l'appareil. Au fur et à mesure que baissait cette température, reconnue limite pour un débit déterminé et une certaine teneur de l'émulsion en microbes, soit en diminuant la température du bain-marie, soit en augmentant la pression de l'azote sur l'émulsion, ce qui augmente proportionnellement le débit, je prélevais des échantillons de l'émulsion et l'enseménçais sur gélose en boîtes de Pétri.

Les résultats étaient des plus nets et concordants. Les ensemencements devenaient positifs et le nombre des colonies engendrées croissait parallèlement à l'abaissement provoqué de la température.

Dans cet appareil :

La surface totale chauffante est en centimètres carrés . . $S = 1.500$

La capacité des deux cuves en centimètres cubes $C = 1,5$

Le rapport de la capacité à la surface totale. $\frac{S}{C} = 1.000$

La vitesse utile pour la stérilisation, attendu que la longueur du trajet dans les deux cuves parallèles est de 50 centimètres, varie donc, pour les débits ci-dessus, de une demi-seconde à trois dixièmes de seconde environ par mètre linéaire.

Dans l'appareil à tube aplati replié en serpentín, mesurant 250 centimètres, 43 millimètres de tour extérieur et 1 millimètre de section (le creux entre les deux larges faces parallèles du ruban),

La surface totale de chauffage est en centimètres carrés . $S = 1.075$

La capacité en centimètres cubes. $C = 107,5$

Le rapport de la capacité à la surface. $\frac{S}{C} = 10$

Ce rapport est donc cent fois plus réduit dans cet appareil que dans l'appareil précédent. Néanmoins, grâce à ce que le liquide y accomplit un trajet cinq fois plus grand et que l'on y ralentit, d'autre part, la vitesse du liquide, on parvient également à atteindre avec lui la stérilisation. Il faut encore, cependant, qu'on se borne à y traiter des liquides relativement peu chargés en microbes, comme les liquides alimentaires.

Dans l'appareil à tubes concentriques que j'ai employé pour

mes premiers essais de tyndallisation des œufs, jaune et blanc mélangés, et de stérilisation du lait, par ce système, constitués par deux groupés de tubes de 1 m. 95 cent. de longueur et respectivement de 11×13 et $14,8 \times 17$ millimètres de diamètre, la surface totale chauffante comprenant les deux surfaces,

L'extérieur et l'intérieur de l'interstice annulaire sont en centimètres carrés.	S = 3.426
La capacité en centimètres cubes (l'interstice se réduisant à $8/10^e$ par l'effet de l'étamage des deux surfaces).	C = 132
Le rapport de la capacité à la surface totale.	$\frac{S}{C} = 26$

Cependant, pas plus que le précédent, cet appareil à tubes concentriques ne se prête à la stérilisation de liquides trop chargés en microbes, même si l'on arrive à en réduire à cinq dixièmes ou seulement à quatre dixièmes de millimètre, par l'étamage des surfaces rapprochées, l'interstice annulaire, avec l'emploi de tubes moins longs, mais coulissant l'un dans l'autre à frottement très doux, et que l'on porte à 4 ou 5 mètres la longueur totale des différents éléments mis ensemble. Dans un des essais que j'ai pratiqués avec précisément un semblable groupement, la température du bain-marie étant de 70^e et le débit de 120 litres par heure, des 4 milliards de microbes par centimètre cube de l'émulsion que j'y fais passer, 120 millions, par centimètre cube, en sont sortis vivants. Ce qui représente déjà un beau résultat, si on tient compte du débit de fontaine de l'appareil.

L'action particulière des surfaces chauffantes s'y est donc exercée d'une façon indéniable, malgré la rapidité de l'écoulement et l'écartement, relativement considérable, de ces mêmes plaques. On serait même porté à penser, devant ce résultat, que si l'on allongerait davantage encore le circuit de l'émulsion entre elles, ou si on élevait de quelques dizaines de degrés la température du bain-marie, on parviendrait même à atteindre ces 120 millions de bacilles typhiques, par centimètre cube, réchappés de la première épreuve.

Cet essai, je ne l'ai pas tenté pour ne pas retomber à peu près, par un chemin détourné, dans les mêmes errements de la stérilisation en vase clos. Le principal défaut de ce procédé

précisément d'atteindre très inégalement les microbes des émulsions que l'on y soumet, et ce ne serait qu'à ce prix, en portant sur eux d'une façon très inégale l'effet des plaques chauffantes, que l'on arriverait à la stérilisation complète de l'émulsion, avec pareil groupement métamérique démesurément allongé ou surchauffé.

Au contraire, dans ce cas se rapportant aux émulsions microbiennes dont on se sert pour l'étude de l'agglutination ou pour fabriquer des vaccins, on peut grouper très avantageusement quelques-uns de ces éléments à tubes concentriques au stérilisateur décrit plus haut, à trois plaques coniques. La place de ce dernier est tout indiquée, immédiatement avant la sortie, à l'endroit où déjà l'émulsion est parvenue à la température utile de stérilisation et où déjà la grande majorité des microbes qu'elle renferme en ont subi l'action. Dans l'appareil à trois plaques, qui sert à la fois de frein à la circulation dans le cheminement antérieur à couche annulaire semi-mince, s'achève alors rapidement la stérilisation, grâce à la filière très réduite par laquelle, à deux reprises, il l'oblige à passer avant de sortir et à être ramenée promptement à la température ordinaire.

Dans ces circonstances, on peut tirer tout le parti du principe qui l'informe, la disposition du liquide en couche mince et le renouvellement de cette couche, sans avoir à craindre que la température utile vienne à fléchir au cours de l'opération.

Et grâce à cette avantageuse combinaison, on arrive à un autre résultat, non moins intéressant. On parvient à stériliser les émulsions mêmes de la teneur de 4 et 5 milliards de microbes par centimètre cube, non seulement dans une fraction de seconde, résultat déjà acquis dans mes premiers essais avec les appareils à plaques planes, mais à une température des surfaces chauffantes qui ne dépasse pas de 2°, 3° au plus la température du bain-marie à laquelle on effectue ce traitement par le procédé courant, en ampoules scellées.

Je reviendrai sur la conduite de ces stérilisations, ainsi que sur celle des autres applications du principe que j'ai préconisé : telle la pasteurisation du lait et de la bière, la stérilisation du lait, entrant dans la description détaillée des

appareils et dans l'analyse biologique des résultats que l'on en obtient.

J'ajouterai seulement en terminant la remarque suivante, qui a trait directement à toutes les applications du procédé de stérilisation des liquides par la chaleur en circulation continue et concerne tout spécialement les caractères techniques généraux des appareils, dont il est question précisément dans ce dernier chapitre.

D'une façon générale, lorsque, entre la température des surfaces chauffantes, autrement dit du bain-marie ou de la circulation de vapeur, et la température qu'accuse le liquide traité, à la sortie du stérilisateur, l'écart se maintient dans la limite de 2° à 3°, on peut affirmer que l'opération est bien conduite et que le développement de l'appareil employé est proportionné à sa tâche.

Le Gérant : G. MASSON.

